



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE *in vitro* e *in vivo* DO EXTRATO
AQUOSO DAS FOLHAS DE *Centratherum punctatum* ssp *punctatum*
Cass. (Asteraceae)**

DANIELLA FERNANDES DE CARVALHO

TERESINA

2012

DANIELLA FERNANDES DE CARVALHO

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE *in vitro* e *in vivo* DO EXTRATO
AQUOSO DAS FOLHAS DE *Centratherum punctatum* ssp *punctatum*
Cass. (Asteraceae)**

TERESINA

2012

DANIELLA FERNANDES DE CARVALHO

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE *in vitro* e *in vivo* DO EXTRATO
AQUOSO DAS FOLHAS DE *Centratherum punctatum* ssp *punctatum*
Cass. (Asteraceae)**

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a Dr^a Roseli Farias Melo de Barros

Presidente e Primeiro Examinador Interno

(Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UFPI)

Prof^a Dr^a Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante

Co-orientadora

(Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UFPI)

Prof^a Dr^a Gardene Maria de Sousa

(Departamento de Biologia – UFPI)

Prof^a Dr^a Antônia Maria das Graças Lopes Citó

(Departamento de Farmácia – UFPI)

TERESINA

2012

REITOR

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Prof^a. Dr^a. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Saulo Cunha de Serpa Brandão

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Antonio dos Santos Rocha Filho

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

José Guilherme Ferre Pompeu

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Lívio Cesar Cunha Nunes

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas-PPGCF e ao corpo de funcionários do Núcleo de Tecnologia Farmacêutica (NTF), pela disponibilidade e convivência.

À Professora Dra Roseli Farias Melo de Barros, por sua orientação e paciência em todas as etapas do trabalho.

À Professora Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante por ser sempre solícita e disposta a contribuir.

A George Laylson e Alisson Dantas, pela sua intensa colaboração na realização dos testes.

A Deus, que meu deus forças para enfrentar os obstáculos e superá-los.

Agradeço a minha mãe Joana Dalva, meu maior exemplo de mulher! Obrigada pelo teu esforço, sacrifício e incentivo. Teu companheirismo e tua paciência são o meu refúgio.

À minha avó Maria de Jesus, por todos os ensinamentos transmitidos. Obrigada por transmitir tranquilidade e paz em momentos difíceis.

Ao meu pai, que mesmo distante, torce por mim e se orgulha por este trabalho realizado.

À minha família, pelo apoio recebido.

E a todos os demais que contribuíram de alguma forma para as etapas desse trabalho.

*A possibilidade de realizarmos um sonho é o que torna
nossa vida interessante”*

(Paulo Coelho)

Dedico este trabalho à minha família pelo apoio incondicional, amor, paciência e incentivo.

Estudo do potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo* do extrato aquoso das folhas de *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* cass. (Asteraceae). DANIELLA FERNANDES DE CARVALHO. Orientador: Roseli Farias Melo de Barros. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Bioquímica e Farmacologia, UFPI, 2012.

RESUMO

O desbalanço entre a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e os antioxidantes, que são moléculas capazes de diminuir os efeitos nocivos gerados pelas EROS, pode resultar em condições patogênicas. Os antioxidantes podem colaborar na prevenção desse processo por meio da diminuição da injúria celular oxidativa, aumento ao estímulo de sistemas de defesa celular e proteção da oxidação do DNA, além da inibição da apoptose em células de órgãos vitais. *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* Cass. (Asteraceae), popularmente conhecida como perpétua-roxa, é utilizada na medicina tradicional como antioxidante, antimicrobiana e antiproliferativa. Este estudo buscou realizar a triagem fitoquímica do extrato aquoso das folhas de *C. punctatum*, quantificar o teor de compostos fenólicos e flavonóides, avaliar a atividade antioxidante *in vitro* através dos métodos dos radicais DPPH e ABTS, além de avaliar as possíveis atividades tóxicas em *Artemia Salina* L.; oxidantes, protetora, antioxidantes e de reparo do extrato, frente aos danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em *Saccharomyces cerevisiae* nas concentrações de 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL em pré, co e pós-tratamento. A CL₅₀ do extrato aquoso de *C. punctatum* foi de 3697,57 µg/mL. A análise da prospecção fitoquímica do extrato indicou a presença de importantes metabólitos secundários para tratamentos medicinais como flavonóides e taninos. Os compostos fenólicos presentes no extrato variam de 3775,48 ± 8,60 mg EAG/g AM e os flavonóides encontrados variaram de 2131,15 ± 40,98 mg ER/g MS. A análise antioxidante mostrou que o extrato aquoso tem capacidade de reduzir os radicais DPPH• e ABTS•+ em todas as concentrações testadas. O extrato não apresentou ação oxidante frente às linhagens testadas e protegeu as linhagens contra os danos induzidos pelo H₂O₂. No co-tratamento, todas as concentrações do extrato apresentaram atividade antioxidante. Atividades de reparo também foram observadas em todas as concentrações testadas. O extrato testado apresenta-se como uma fonte natural de compostos antioxidantes e que pode ser usado, especialmente, para formulações farmacológicas que venham minimizar os efeitos do estresse oxidativo.

Palavras-chaves: Antioxidantes; *Saccharomyces cerevisiae*; *Centratherum punctatum*; fitoquímica; compostos fenólicos.

Study of antioxidant potential *in vitro* and *in vivo* of aqueous extract of leaves of *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* Cass. (Asteraceae). **DANIELLA FERNANDES DE CARVALHO**. Adviser: Roseli Farias Melo de Barros. Dissertation. Graduate Program in Pharmaceutical Sciences. Health Sciences Center Department of Biochemistry and Pharmacology, UFPI, 2012.

ABSTRACT

The imbalance between the production of Reactive Oxygen Species (ROS) and antioxidants, which are molecules able to reduce the harmful effects generated by ROS can result in pathogenic conditions. Antioxidants can help prevent this process by decreasing the oxidative cellular injury, increase the stimulation of cellular defense systems and protection of DNA oxidation, and inhibition of apoptosis in cells of vital organs. *Centratherum punctatum* spp *punctatum* Cass. (Asteraceae), popularly known as perpetual purple, is used in traditional medicine as an antioxidant, antimicrobial and antiproliferative. This study sought to perform phytochemical screening of the aqueous extract of leaves of *C. punctatum*, quantify the phenolic content and flavóniodes, evaluate the *in vitro* antioxidant activity using the methods of DPPH and ABTS radicals, and to evaluate the possible toxic activities in *Artemia Salina* L.; Oxidants, protective antioxidants and repair of the extract, compared to oxidative damage induced by hydrogen peroxide (H₂O₂) in *Saccharomyces cerevisiae* at concentrations of 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/ mL and 1000 µg/mL in pre, co-and post-treatment. The LC₅₀ of aqueous extract of *C. punctatum* was 3697.57 µg/mL. The phytochemical analysis of the extract indicated the presence of important secondary metabolites for medicinal treatments such as flavonoids and tannins. The phenolic compounds present in the extract range from 3775.48 + 8.60 mg EAG/g AM and flavonoids found variaramm of 2131.15 + 40.98 mg ER/g MS. The analysis showed that the antioxidant aqueous extract has the ability to reduce radical DPPH• and ABTS• + at all concentrations tested. The extract showed no oxidizing action against the tested strains and the strains protected against damage induced by H₂O₂. In the co-treatment, all concentrations of the extract showed antioxidant activity. Repair activities were also oberservadas at all concentrations tested. The extract tested presents itself as a natural source of antioxidants and compounds that can be used especially for pharmaceutical formulations which may minimize the effects of oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Detalhe da inflorescência de <i>Centratherum punctatum</i> ssp <i>punctatum</i> Cass.	19
Figura 2. Estrutura geral dos flavonóides	21
Figura 3. Reação entre o radical DPPH• com um composto antioxidante.....	26
Figura 4 . <i>Artemia salina</i> Brine shrimp	31
 CAPÍTULO 1	
Quadro 1. Descrição das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> usadas no estudo. Adaptado Gasparri, 2005	41
Figura 1. Avaliação oxidante do extrato aquoso das folhas de <i>Centratherum punctatum</i> ssp <i>punctatum</i> Cass. em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pela inibição de crescimento no teste do disco central.	50

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1.** Desenho dos experimentos para a avaliação dos efeitos dos extratos aquoso das folhas de *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* Cass. adiante dos danos induzidos pelo H₂O₂ em *Saccharomyces cerevisiae* 42
.....
- Tabela 2.** Principais grupos fitoquímicos identificados no extrato aquoso das folhas de *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* Cass. coletados na cidade de Teresina/PI 46
.....
- Tabela 3.** Valor da CL₅₀ do extrato aquoso das folhas de *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* Cass. com o intervalo de confiança de 95%..... 46
- Tabela 4.** Avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso das folhas de *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* Cass. coletados na cidade de Teresina/PI.pelo método de redução do radical DPPH• 47
.....
- Tabela 5.** Avaliação da atividade antioxidante equivalente ao Trolox do extrato aquoso das folhas de *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* Cass. coletadas na cidade de Teresina/PI. 49
.....
- Tabela 6.** Atividade protetora do extrato aquoso das folhas de *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* Cass observada frente aos danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio avaliadas pela inibição de halos em *Saccharomyces cerevisiae* 51
.....
- Tabela 7.** Atividade antioxidante do extrato aquoso das folhas de *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* Cass observada frente aos danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio avaliadas pela inibição de halos em *Saccharomyces cerevisiae* 52
.....
- Tabela 8.** Atividades de reparo do extrato aquoso das folhas de *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* Cass. observada frente aos danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio avaliadas pela inibição de halos em *Saccharomyces cerevisiae*. 54
.....

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA- Ácido Desoxirribonucléico

O₂ - Oxigênio

EROS - Espécies Reativas de Oxigênio

DPPH - 2,2 difenil-1-picrilhidrazilo

Sod- Superóxido Dismutase

Sod WT – Linhagem Selvagem

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

Cat - Enzima Catalase

GSH-Px Glutathiona Peroxidase

OH• – Radical Hidroxila

Sod 1Δ - Linhagens da enzima Superóxido Dismutase do Citoplasma Mutada

Sod 2Δ – Linhagens da enzima Superóxido Dismutase da Mitocôndria Mutada

Sod 1Δ/sod2Δ- Linhagens da enzima Superóxido Dismutase do Citoplasma e Mitocôndrias Mutadas

Cat1Δ – Linhagens da enzima Catalase do Citoplasma Mutada

Sod 1 Δ/Cat1Δ – Linhagens das enzimas Superóxido Dismutase e Catalase do Citoplasma Mutadas

ANOVA - Análise de Variâncias

CP - Controle Positivo

CN - Controle Negativo

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1 INTRODUÇÃO	14
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 Plantas medicinais	17
2.2 <i>Centratherum punctatum</i> ssp <i>punctatum</i> Cass	19
2.3 Compostos Fenólicos e Flavonóides	20
2.4 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Antioxidantes	22
2.5 Biomarcadores da capacidade antioxidante de compostos naturais.....	25
2.5.1 Testes <i>in vitro</i>	25
2.5.2 Testes <i>in vivo</i>	28
2.6 Bioensaio <i>Artemia salina</i>	30
3 CAPÍTULO 1: Estudo do potencial antioxidante <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> do extrato aquoso das folhas de <i>Centratherum punctatum</i> spp <i>punctatum</i> Cass. (Asteraceae)	32
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
5 PERSPECTIVAS	65
REFERÊNCIAS	66
APÊNDICE	81

1 INTRODUÇÃO

A história do uso de plantas medicinais tem mostrado que elas fazem parte da evolução humana e foram os primeiros recursos terapêuticos utilizados. As antigas civilizações tiveram suas próprias referências históricas às plantas medicinais e, muito antes de aparecer qualquer forma de escrita, o homem já utilizava as plantas e, entre estas, algumas como alimento e outras como remédio. Nas suas experiências com ervas, tiveram sucessos e fracassos, sendo que em muitas vezes estas curavam e em outras matavam ou produziam efeitos colaterais severos (DORTA, 1998).

Na corrida pela busca de novos fármacos, a flora nacional contribui de forma significativa, constituindo-se a mais diversificada de todo o planeta, e, além disso, é detentora de aproximadamente 7% de espécies endêmicas (DINIZ; FERREIRA, 2000). Estimativas apontam que existam entre 55 e 80 mil espécies vegetais somente na Amazônia, sendo que destas, somente 2% foram estudadas sob algum aspecto pelos cientistas (NASCIMENTO, 2006).

Nos países em desenvolvimento, como o Brasil, as pessoas utilizam os chás medicinais para o tratamento de doenças. O seu consumo deve ser monitorado, com o objetivo de alertar a população humana sobre os efeitos dos mesmos sobre organismos vivos (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007).

Barros (2002) refere que Kirkman (1981) efetuou a revisão do gênero *Centratherum* Cass. (Asteraceae), considerando apenas duas espécies (*C. punctatum* Cass. e *C. confertum* Kirkman), sinonimizando as demais e considerando três subespécies, uma australiana (*C. punctatum* spp *australianum*), uma asiática (*C. punctatum* ssp *fruticosum*) e uma ocorrente na América do Sul e Central (*C. punctatum* ssp *punctatum*). Quanto a sua distribuição, Adams (1972) refere sua ocorrência na América Central (Jamaica, Panamá e Trindade) e na América do Sul é encontrada na Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Paraguai, Peru, Uruguai e Venezuela (GLEASON, 1922; LEITÃO FILHO, 1972; PRUSKI, 1997). No Brasil é registrada para todos os estados do Nordeste, além de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Santa Catarina, São Paulo e Paraná (MALME, 1934; LEITÃO FILHO 1972, 1991; CABRERA ; KLEIN, 1980; NUNES

1982; NAKAJIMA, 2000). Barros (2002) cita ainda, sua ocorrência na vegetação de caatinga, bordas de mata, tabuleiro, campo rupestre e no cerrado, como planta ruderal, sendo reconhecida popularmente no Nordeste pelos nomes vernaculares de perpétua-roxa-do-mato, vassourinha-roxa, perpétua-brava-do-mato, perpétua-do-mato, melosa, aletria e suspiro-de-cachorro; em Santa Catarina é denominada de perpétua-roxa-do-mato e perpétua.

Centratherum punctatum pode ser recomendada para o uso no paisagismo do entorno de edificações das unidades de conservação ou no paisagismo urbano como componente de alegretes ou mesmo como forração. Usada na medicina tradicional, estudos relatam atividade antioxidante, antimicrobiana e antiproliferativa dessa planta medicinal (GBOLADE et al., 2009).

Recentemente, do óleo essencial das folhas dessa planta foram isolados 59 diferentes compostos. Centratharina, uma lactona sesquiterpênica, tem sido apontada como a responsável por suas propriedades anti-helmínticas, antifilaríose e anti-hiperglicêmica (BEVELLE et al., 1981; NISHA et al., 2007; ANI; Naidu , 2008).

Apesar dos relatos acerca das propriedades farmacológicas de *Centratherum punctatum* Cass., ainda existe a necessidade de mais estudos para averiguar suas atividades biológicas, bem como estudos que relatem suas análises fitoquímicas, bioquímicas, microbiológicas, e especialmente antioxidantes em sistemas *in vitro* e *in vivo*.

Diante do exposto, o objetivo do estudo em foco foi avaliar as possíveis atividades tóxicas de *Centratherum punctatum* Cass. em *Artemia salina*; oxidantes, antioxidantes, protetora e de reparo de DNA do extrato aquoso de suas folhas pelo teste do disco central, frente aos danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em *Saccharomyces cerevisiae* proficientes (SOD WT) e deficientes (Sod1Δ, Sod2Δ, Sod1Δ/Sod2Δ, Cat1Δ, Sod1Δ/Cat1Δ) em enzimas antioxidantes, além de avaliar a atividade antioxidante *in vitro* através dos testes dos radicais DPPH• e ABTS•+; quantificar o teor de compostos fenólicos e flavonóides do extratos e realizar sua prospecção fitoquímica.

A presente dissertação está apresentada em Fundamentação Teórica e Capítulo I seguidos das Considerações Finais. Na Fundamentação Teórica são relatados alguns estudos sobre o *C. punctatum*, efeitos biológicos, destacando-se a caracterização de estresse oxidativo, compostos fenólicos e marcadores de atividades antioxidantes *in vitro* e *in vivo*, enfatizando especialmente, o uso de *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de atividades antioxidantes. No Capítulo I são relatados os resultados dos experimentos para o extrato aquoso das folhas de *C. punctatum* sobre a avaliação tóxica em *Artemia salina*, atividade antioxidante através dos radicais DPPH e ABTS, quantificação de compostos fenólicos e flavonoides; e atividades oxidante, protetora, antioxidante e de reparo frente aos danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio em *S. cerevisiae*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Plantas Medicinais

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define plantas medicinais como espécies vegetais que possuem em um de seus órgãos, ou em toda a planta, substâncias que se administradas ao ser humano ou a animais, por qualquer via e sob qualquer forma, exercem algum tipo de ação farmacológica (OMS, 2003).

Para Pitman (1996) e Silva et al. (2007), as origens da fitoterapia, ou seja, do uso de plantas medicinais, datam dos primórdios da vida humana, já que os seres humanos sempre usaram plantas, tanto na alimentação, quanto com fins medicinais. A denominação fitoterapia é um termo nitidamente derivado de um saber erudito, cuja variante popular, normalmente encontrada, denomina-se “uso de folhas, plantas ou ervas de chá”.

De acordo com Laplantine e Rabeyron (1989), esse uso medicinal das plantas faz parte da medicina popular, que deve ser entendida como uma das práticas da medicina paralela, que engloba, de forma não sistematizada e, muitas vezes, sem comprovação científica, imensa variedade de métodos terapêuticos tradicionais, fundamentados em conhecimentos e habilidades que se inscrevem no âmbito do empirismo médico. Esse conhecimento é transmitido, essencialmente, de forma oral e gestual pelas famílias, através das sucessivas gerações.

Segundo Pitman (1996) o conhecimento sobre as plantas medicinais é proveniente, pelo menos, de três fontes principais: a observação cuidadosa dos efeitos de certos alimentos e condimentos, dando a ideia de como utilizá-los em caso de doenças; a observação das atitudes de animais e insetos perante as plantas, inspirando o ser humano a utilizar tais vegetais como elementos de cura; e a observação das características próprias das plantas e a formulação de ideias acerca das suas qualidades, seguidas da experimentação dos seus efeitos. Em resumo, por meio da tentativa e do erro, pouco a pouco os povos mais primitivos da história da humanidade passaram a conhecer as plantas de seu ecossistema e a reconhecer suas propriedades, inclusive às medicinais.

Lorenzi e Matos (2002) citam que, no Brasil, a história da utilização de plantas, no tratamento de doenças, apresenta influências da cultura africana, indígena e europeia. A contribuição dos escravos africanos com a tradição do uso de plantas medicinais em nosso país se deu por meio das plantas que trouxeram consigo, e que eram utilizadas em rituais religiosos e também por suas propriedades farmacológicas empiricamente descobertas. Os índios que aqui viviam dispostos em inúmeras tribos utilizavam uma grande quantidade de plantas medicinais e, por intermédio dos pajés, este conhecimento, sobre as ervas locais e seus usos, foi transmitido e aprimorado de geração em geração. Os primeiros europeus que chegaram ao Brasil depararam-se com estes conhecimentos, que foram absorvidos por aqueles que passaram a viver no país e a partir da necessidade de viver do que a natureza tinha a oferecer localmente, assim como o contato com os índios que passaram a auxiliá-los como “guias”, fizeram com que estes ampliassem esse contato com a flora medicinal brasileira.

Para Simões et al. (2004), o crescente interesse ao uso de plantas medicinais está relacionado a vários fatores, entre eles o alto custo dos medicamentos industrializados, a crise econômica, a falta de acesso da população à assistência médica e farmacêutica e uma tendência dos consumidores em utilizar produtos de origem natural.

Tomazzoni (2004) refere que, até o século XX, se fazia grande uso das plantas medicinais para a cura de inúmeras doenças, sendo esta prática uma tradição que foi sendo transmitida ao longo dos tempos. No entanto, com o advento da industrialização, da urbanização e o avanço da tecnologia no que diz respeito à elaboração de fármacos sintéticos, houve aumento por parte da população da utilização destes medicamentos, deixando-se de lado o conhecimento tradicional das plantas medicinais, que foram vistas como atraso tecnológico, levando, em parte, à substituição da prática de sua utilização na medicina caseira.

Para Simões et al. (2004), o crescente interesse ao uso de plantas medicinais está relacionado a vários fatores, entre eles o alto custo dos medicamentos industrializados, a crise econômica, a falta de acesso da população à assistência médica e farmacêutica e uma tendência dos consumidores em utilizar produtos de origem natural.

2.2 *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* Cass.

Barros (2002) reporta em seu trabalho uma descrição botânica detalhada da espécie: ervas a subarbustos de 20 a 80 cm de altura, perenes, eretos a levemente prostados, ramosos. Ramos cilíndricos, multisulcados, sulcos conspícuos, esverdeados a ligeiramente purpúreos, indumento viloso, entremeado por tricomas longo-setosos, esparsos, canescentes. Folhas alternas, membranáceas, concolores, lanceoladas, oblongo-lanceoladas a elípticas, base longamente atenuada, assimétrica, ápice agudo, margem serrada. Inflorescência terminal, em ramos folhosos de capítulos solitários. Capítulo com 70 a 140 flores. Invólucro externo folhoso, brácteas involucrais, desiguais, quase sempre excedendo o tamanho do capítulo. Receptáculo plano, sub-alveolado. Flores até 5,6mm de comprimento, hermafroditas, isomorfias; corola com 5,5mm magenta a púrpura. Estames com filetes de 0,5mm de comprimento; antera com 2 mm de comprimento. Ovário com 1 mm de comprimento e estilete com 5,5-7 mm de comprimento, estilopódio inconspícuo.

Figura 1. Detalhe da inflorescência de *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* Cass.



Fonte: Arquivo Pessoal

Atividades farmacológicas como anti-helmínticas, anti-filiaríose e anti-hiperglicêmica de *C. punctatum* têm sido atribuídas principalmente com base na presença de uma lactona sesquiterpênica, conhecida como Isocentratherina (BEVELLE et al., 1981). Extratos dessa planta têm demonstrado atividade antimicrobiana (CHIAPPETA; MELLO, 1984).

Diversos autores já conseguiram isolar constituintes presentes em *C. punctatum* a partir de várias partes da planta como alguns compostos sesquiterpênicos, que incluem centratherinas, 5-epi-isocentratherina, goiazensolidios, lichnophorolidios A&B, 14-carboxil-15-dimetil- costunolide, eremantina, 8 α -iso-valeroil-oxi-dehidro-costuslactona e, (13)-dehidro-1-saussurea lactona (OHNO, CORMICKANDE e MABRY, 1979; BOHLMANN et al., 1980; MANCINI, BERNARDI e JORGE NETO, 1983; MANCHAD et al., 1983; BANERJEE et al., 1986; VALDES et al., 1998).

Com relação à fração volátil desta espécie, as composições do óleo essencial das amostras coletadas no Brasil têm revelado a abundância de hidrocarbonetos da fração sesquiterpênica, como β -cariofileno, o constituinte mais abundante encontrado (MANCINI et al., 1983; CRAVEIRO et al., 1984).

Segundo Arumugam e Pawar (2011), dos quatro diferentes extratos das folhas de *C. punctatum* testados, a fração acetona exibiu as maiores capacidades antimicrobiana, antioxidante e antiproliferativa, atividades resultantes da presença de grupos químicos como os flavonóides.

Ani e Naidu (2008) relatam que nos extratos de *Centratherrum anthelminticum* (L.) Kuntze testados, apresentaram uma mistura de compostos polifenólicos semelhantes aos observados nos extratos de *C. punctatum*, evidenciando efeito antihiperglicêmico diminuindo a glicose pós-prandial em ratos através da modulação α -amilase e glucosidases

2.3 Compostos Fenólicos e Flavonóides

Segundo Simões et al. (2010), os compostos fenólicos pertencem a uma classe que incluem uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático, no qual, ao menos, um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila.

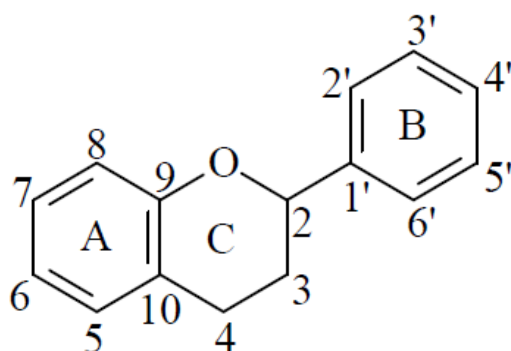
Os compostos fenólicos podem ser classificados segundo o tipo de esqueleto principal ou com a ocorrência desses compostos no reino vegetal. Assim, os compostos fenólicos de plantas podem ser divididos em fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (SOUSA et al., 2007; SIMÕES et al., 2010;).

Maia (2008) afirma que apesar de não apresentarem importância nutricional direta, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção devido as suas propriedades farmacológicas, por inibirem a oxidação lipídica e a proliferação de fungos, além de participarem de processos responsáveis pela cor, adstringência e aroma em vários alimentos.

Os compostos fenólicos são encontrados comumente nas plantas e apresentam muitos efeitos biológicos, incluindo a atividade antioxidante. O potencial antioxidante desses compostos é devido principalmente a propriedade redox e estrutura química, que desempenham funções importantes de neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição (SILVA et al., 2011).

Os flavonóides constituem uma vasta família de pigmentos fenólicos encontrados nas plantas e alimentos. São biossintetizados a partir da via mista dos fenilpropanóides com malonil-CoA e caracterizados por apresentarem 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental com dois anéis aromáticos unidos por uma cadeia de três átomos de carbono podendo ou não formar um terceiro anel (C6-C3-C6). A Figura 2 mostra a estrutura básica dos flavonoides.

Figura 2 – Estrutura geral dos flavonóides



Flavonóide é um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural, sendo encontrados em plantas principalmente sob a forma de glicosídeos. São responsáveis pelos pigmentos amarelos, laranjas, azuis e vermelhos das flores e importantes para o crescimento normal, desenvolvimento e defesa das plantas. Favorecem a polinização atuando como atrativos visuais, atuando como mecanismo de defesa diante do ataque de insetos e microorganismos e como protetores da radiação ultravioleta por suas propriedades antioxidantes (MUCHIETTI; MARTINO, 2006).

Apesar de não serem considerados nutrientes, os flavonóides são importantes na dieta humana. A eles são atribuídas diversas atividades biológicas, tais como: antiosteoporóticos (EVANS, 1994), antihepatotóxicas (SOIKE; PESCHLOW, 1987), antiespasmódico (CAPASSO et al., 1991), anti-secretório e antidiarréico (DI CARLO et al., 1993). São atribuídas ainda outras propriedades: antioxidante, moduladores da atividade enzimática, prevenção do câncer e doenças cardiovasculares, antiinflamatórias e antivirais (SIMÕES et al., 2010). Dentre estas propriedades, a capacidade antioxidante é a mais descrita (HARBONE; WILLIAMS, 2000).

2.4 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Antioxidantes

Define-se oxidação como uma reação onde há perda de elétrons, ficando a parte doadora “carregada” positivamente (DECKER, 2002). Kondo, Kurihara e Fukuhara (2001) definem a oxidação como ganho de oxigênio ou perda de elétrons, enquanto redução é perda de oxigênio ou ganho de elétrons. É um processo que ocorre em praticamente todos os tipos de moléculas, sejam estas inorgânicas ou orgânicas. Devido à presença do oxigênio do ar, ocorre um ciclo, onde os subprodutos gerados pela oxidação são altamente reativos e, por isso, são também responsáveis pela aceleração dos processos oxidativos, fazendo com que tal evento se torne uma reação em cadeia. Moléculas conhecidas como antioxidantes atuam “sequestrando” esses elétrons sem formar um novo radical reativo, ou seja, parando o processo de oxidação ou reduzindo a sua velocidade.

Segundo Bravard et al. (2002) os níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) são normalmente controlados por um sistema de defesa antioxidante, como as enzimas: MnSOD (superóxido dismutase contendo manganês), CuZnSOD (superóxido dismutase contendo cobre-zinco), CAT (Catalase) e GPX (glutathiona peroxidase). A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio, que é degradado pela ação de CAT e GPX. Medidas diretas de radicais livres e EROs podem capturar reações de radicais livres em tempo real, porém, estes métodos são caros e difíceis.

Cao e Prior (1998) cita que enquanto oxidante e redutor são termos químicos, em termos biológicos surgem durante os processos de oxidação e são geralmente denominados como pró-oxidante e antioxidante, respectivamente. Pró-oxidante é uma substância que pode induzir dano oxidativo a vários alvos biológicos, tais como ácidos nucleicos, lipídios (por exemplo, peroxidação), e as proteínas (por exemplo, oxidação de resíduos de aminoácidos específicos). Refere ainda que, um antioxidante é uma substância que pode reduzir eficazmente um pró-oxidante com a formação concomitante de produtos com pouca ou nenhuma toxicidade.

Com efeito, uma definição mais ampla de antioxidante foi sugerido por Halliwell et al. (1995) como "qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparado com os de um substrato oxidável impede significativamente a oxidação do referido substrato". Portanto, de acordo com esta definição, nem todos os redutores envolvidos numa reação química são antioxidantes; apenas os compostos que são capazes de proteger o alvo biológico satisfazem esses critérios.

Para Wardman (2007), Somogyi et al. (2007), Armstrong e Whiteman (2007), Hwang e Bowen (2007) e Mateos e Bravo (2007), esta proteção pode ser baseada em vários mecanismos de ação, a saber: (1) a inibição da geração e limpeza contra a capacidade de EROS; (2) redução da capacidade de formação de EROS; (3) capacidade quelante de metal; (4) atividade antioxidante como enzimas antioxidantes; (5) inibição das enzimas oxidativas.

Sies (1993) e Leite e Sarni (2003) expuseram que em uma célula normal, existe um equilíbrio entre moléculas pró-oxidantes e antioxidantes. No entanto, esse equilíbrio pode ser deslocado para os pró-oxidantes, quando a

produção de espécies de oxigênio é aumentada grandemente ou quando os níveis de antioxidantes estão diminuídos. Esse estado é chamado de estresse oxidativo e pode causar danos aos lipídios, proteínas, carboidratos, ácidos nucléicos e outras substâncias oxidáveis. Segundo Somogyi et al. (2007) estresse oxidativo representa um desequilíbrio entre a produção e a manifestação da capacidade de um organismo desintoxicar as moléculas altamente reativas ou reparar os danos causados por elas. Geralmente o estresse é causado por dois mecanismos: 1- A concentração de antioxidantes é reduzida devido à mutação de enzimas, toxinas ou à redução de ingestão de antioxidantes naturais; 2- Há um aumento na produção de EROs.

Scott (1993) cita que a origem de antioxidantes remonta à antiguidade. Em particular, somos lembrados do notável conhecimento técnico do antigo Egito na preservação de cadáveres, em parte devido ao uso de extratos vegetais ricos em polifenóis. Embora tais estudos tenham se iniciado de forma empírica no final dos anos 1870 e início de 1900, por volta de 1940 alguns mecanismos de oxidação de radicais livres foram elucidados e alguns antioxidantes tiveram suas estruturas identificadas.

De acordo com Canterle (2005), cada vez mais o uso de antioxidantes naturais tem aumentado com as descobertas das propriedades de algumas substâncias produzidas a partir do metabolismo secundário de plantas. Atribui-se a atividade antioxidante dos componentes produzidos pela maioria dos vegetais à presença de compostos fenólicos, destacando-se os flavonóides. Esses componentes podem atuar como agentes redutores, sequestradores de radicais livres, quelantes de metais ou desativadores do oxigênio singlete e/ou exibir simultaneamente, mais de uma dessas funções.

Para Shahidi, Alasalvar e Liyana-Pathirana (2007) algumas pesquisas têm demonstrado que os compostos fenólicos são químicos que apresentam grande interesse nutricional por contribuir para a saúde humana, devido suas capacidades anticarcinogênica, antimutagênica e antioxidante.

Singh et al. (2008) referem que a pesquisa por antioxidantes naturais tem tido destaque nos últimos anos. Alguns estudos demonstram que o consumo de produtos naturais diminui o risco de o indivíduo adquirir doenças degenerativas.

Pérez-Jiménez et al. (2008) afirmam que a prevenção é uma estratégia mais eficaz que o tratamento para diversas doenças, pois um constante fornecimento de vegetais contendo químicos benéficos à saúde, além da nutrição básica, é essencial por fornecer um mecanismo de defesa que reduza o risco de doenças crônicas em seres humanos.

2.5 Biomarcadores da capacidade antioxidante de compostos naturais

2.5.1 Testes *in vitro*

Hotta et al. (2001) comentam que entre os métodos colorimétricos para determinação da capacidade antioxidante destacam-se aqueles relacionados à habilidade dos antioxidantes em neutralizar radicais como DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila) ou ABTS [sal de amônio do ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzenotiazolina- 6-sulfônico)]. Entre os métodos biológicos existem aqueles que avaliam a capacidade do antioxidante na proteção a peroxidação lipídica e oxidação protéica.

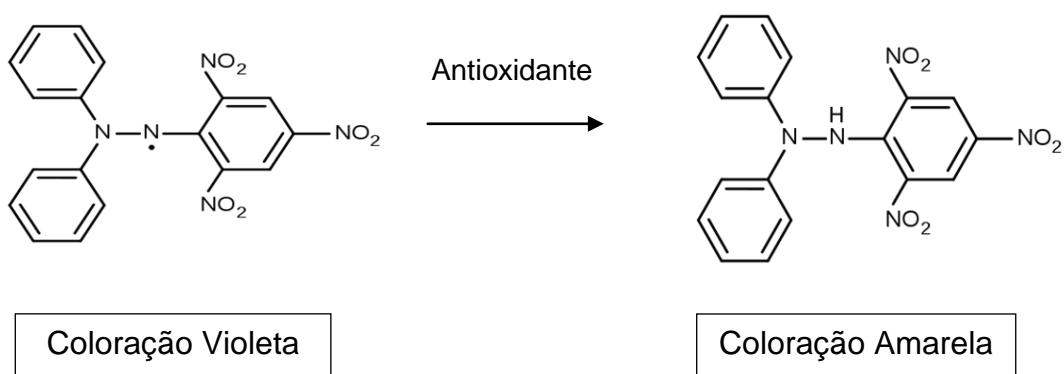
Segundo Roginsky e Lissi (2005), o teste de DPPH é um dos métodos indiretos para se determinar a atividade antioxidante mais antigo sendo sugerido originalmente em 1950 para se descobrir os doadores de hidrogênio em matérias naturais. Mais tarde foi quantificado para determinar o potencial antioxidante de compostos fenólicos isolados e alimentos tão bem como amostras biologicamente relevantes. Para Silva et al. (1999), uma característica desse método é que ele não envolve condições drásticas de temperatura e oxigenação.

O método de DPPH é muito utilizado para se determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas como: compostos fenólicos, fenilpropanóides, fenólicos totais, flavonóis (LEJA et al., 2007), cumarinas (VOGEL et al., 2005), quitosana com diferentes pesos moleculares (KIM; THOMAS, 2006), antocianinas, antocianidinas (LEJA et al., 2007; LIMA et al., 2007), carotenóides (AJILA et al., 2007), rutina, kaempferol (SILVA; BORGES; FERREIRA, 2005).

Souza et al. (2007) citam que em estudo realizado com matéria prima vegetal em estado bruto esse método mostrou-se inadequado devido a sua elevada complexidade química e inerente presença de interferentes potenciais como pigmentos coloridos.

De acordo com Raymundo, Horta e Fett (2004), Chandrasekar et al. (2006) e Kim e Thomas (2006) esse método consiste em avaliar a capacidade antioxidante via atividade sequestradora do radical livre DPPH. O radical DPPH possui coloração púrpura absorvendo a um comprimento de onda máximo de aproximadamente 516 nm. Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R), o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional. O DPPH apresenta-se como um método simples podendo também ser usado para avaliar a atividade antioxidante de formas sintéticas como a nimesulida, dapsona e ácido acetilsalicílico, além de algas, quitosanas, etc., mas por ser um método colorimétrico não é muito aplicado para substâncias coloridas devido a interferências por pigmentos.

Figura 3. Reação entre o radical DPPH• e um composto antioxidante



Sousa et al. (2007) referem que a porcentagem de atividade antioxidante corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE_{50}), também chamada de

concentração inibitória (CI_{50}). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE_{50} e maior a sua atividade antioxidante. A avaliação da atividade antioxidante se dá através da monitorização do consumo do radical livre DPPH pelas alíquotas de ensaio das amostras, através da medida do decréscimo das respectivas medidas de absorbância. As medidas são realizadas em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 515-517nm.

De acordo com Halliwell e Wiseman (1996), os efeitos defensivos de antioxidantes naturais em frutas e vegetais estão relacionados a três grandes grupos: ácido ascórbico e fenólicos como antioxidantes hidrofílicos e carotenóides como antioxidantes lipofílicos. Kuskoski et al. (2005) referem que um dos métodos mais utilizados para medir a atividade antioxidante é através da captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6- ácido sulfônico) (ABTS.+), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. Com essa metodologia, pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica.

Silva, Borges e Ferreira (1999) comentam que o cátion radical ABTS.+ foi obtido em presença de H_2O_2 , apresentando máximos de absorção a 417, 645, 734 e 815 nm. Na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio, pode medir-se a diminuição da formação deste radical por espectrofotometria.

Para Kuskoski et al. (2005) esse radical pode reagir de forma enérgica com compostos doadores de hidrogênio, como compostos fenólicos, sendo convertido em uma forma não colorida de ABTS.+ Na versão comercial do teste ABTS.+ conhecido como protocolo TEAC, o radical ABTS.+ é gerado pela sua reação com o radical ferromioglobina e H_2O_2 na presença de peroxidase. A vantagem desse teste consiste na sua relativa simplicidade que permite a aplicação na rotina de qualquer laboratório.

Borges et al. (2011) caracterizam o valor TEAC como a capacidade da amostra testada em reagir com ABTS.+ , bem como em inibir processos oxidativos. Com muitos compostos fenólicos e em outras amostras com substâncias com atividade antioxidante, isso ocorre lentamente. O resultado da determinação do TEAC é dependente do tempo de incubação e da taxa da amostra quantificada. Esta dependência somada a pouca seletividade do ABTS.+ na reação com átomos doadores de hidrogênio constituem na

limitação desse método. Deste modo, divergências nos resultados de TEAC podem ser atribuídas a fatores limitantes como a diferença no tempo de incubação ou na estratégia de obtenção de ABTS.+.

Re et al. (1999), Nenadis et al. (2004), Ronald, Xianli e Karen (2005), Goulart, Oliveira e Valentim. (2007), Luís et al. (2008) e Anna et al. (2011) referem que o ensaio TEAC avalia a capacidade antioxidante em capturar a estrutura do cátion radical ABTS•+. O cátion radical pré-formado de coloração verde escura é reduzido na presença de compostos antioxidantes e passa para uma coloração verde clara. A concentração do antioxidante e a duração da reação devem ser consideradas para determinar a atividade antioxidante.

2.5.2 Testes *in vivo*

Palanisamy, Ling e Manaharan (2011) citam que o desenvolvimento de novos métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante ou quantificação de antioxidantes específicos em matrizes complexas como extratos vegetais, frutas e alimentos em geral, pode ser justificado pela relevância comercial e farmacológica destes aditivos, bem como pela necessidade de metodologias mais simples e baratas.

Para Neill, Desikan e Hancock (2002), a capacidade antioxidante total de extratos vegetais não traduz precisamente, o que ocorre *in vivo* nas células vegetais, já que nestas há uma atividade dinâmica de um sistema antioxidante formado por enzimas (superóxido dismutase, catalase, ascorbato redutase, etc) e compostos de baixo peso molecular, tais como flavonóides, taninos, ácidos cinâmicos, ácido ascórbico, tocoferol, antocianinas, entre outros.

De acordo com Soares, Andrezza e Salvador (2005), a avaliação da capacidade antioxidante, empregando animais de laboratório é, em geral, de difícil execução e necessita de um número elevado de animais para assegurar resultados estatisticamente significativos. Já os ensaios realizados com microrganismos são fáceis, rápidos e podem utilizar um grande número de células com as mesmas características genéticas.

Henriques et al. (2001) citam que a levedura eucariótica *Saccharomyces cerevisiae* é amplamente utilizada na triagem biológica e testes para prever a

capacidade antioxidante de diversos compostos, pois segundo Marres et al. (1985), tal como acontece com todos os aeróbios, *S. cerevisiae* possui uma variedade de defesas antioxidantes, incluindo enzimas superóxido dismutase (Sod) e Catalase (Cat) e seu metabolismo é semelhante ao de eucariotos superiores, com mecanismos próprios de ativação metabólica (citocromo P450) e de detoxificação, que não estão presentes em bactérias.

Costa e Ferreira (2001) afirmam que as leveduras podem crescer tanto em condições anaeróbias, quanto aeróbias e, portanto, são expostas continuamente às ERO geradas como bioprodutos do metabolismo. A levedura *S. cerevisiae* pertence ao grupo das leveduras anaeróbias facultativas, significando que ela fermenta hexoses, como a glicose e a frutose, independente da concentração de oxigênio.

Brozmanová, Lucio e Barbosa (2001), Henriques et al. (2001) e Maris et al. (2001) dizem que como todos os aeróbios, a *S. cerevisiae* apresenta uma variedade de mecanismos de defesa contra danos oxidativos, como atividades enzimáticas, presença de antioxidantes, sequestradores de metais e diversos mecanismos de reparação. As superóxido dismutase (Sod) são enzimas que fazem a dismutação do radical superóxido a peróxido de hidrogênio. Na célula eucariótica existem três enzimas superóxido dismutase (SODs) descritas: um homotrímero que contém cobre e zinco (CuZnSod - codificada pelo gene da Sod 1), que se encontra no citosol e na matriz nuclear; uma que contém manganês (MnSod - codificada pelo gene da Sod 2), que se encontra predominantemente na matriz mitocondrial. A outra é uma enzima extracelular (Sod 3) (MATES, 2000; JAARSMA et al., 2001; LANDMESSER et al., 2002; ROJKIND et al., 2002).

Srinivasan et al. (2000) definem a Sod 1 como um homotrímero de 32 kDa, importante para defesa contra o estresse oxidativo e de acordo com Mates (2000) sem essa enzima, os animais ficam mais suscetíveis à toxicidade causada pelo paraquat e seriam inférteis. Para Bilinski et al. (1985), as linhagens mutantes Sod1 Δ , que são deficientes nesta enzima, apresentam problemas de crescimento em condições aeróbias, são muito sensíveis a hiperóxia (a substâncias envolvidas em reações tipo ciclo-redox, tais como paraquat ou menadiona, perdem a viabilidade em fase estacionária e são auxotróficas para metionina e lisina em presença de oxigênio. Liu, Ma e Liu

(1992) e Slekar, Kosmann e Wadsworth (1996), acreditam que estas auxotrofias se devem a enzimas relacionadas à síntese destes aminoácidos, que seriam extremamente sensíveis à desativação por O_2^- .

Para Demiryurek e Wadsworth (1999), a Sod 2 é uma proteína 22-kDa, cuja função consiste em evitar e remover O_2^- gerada por danos nas mitocôndrias. As mutantes Sod2 Δ são hipersensíveis ao oxigênio e crescem mal ou não crescem em fontes de carbono não fermentáveis. A sensibilidade a hiperóxia é revertida pela mutação rho0 (leveduras sem mitocôndrias), confirmando o papel decisivo da mitocôndria na geração de O_2^- (GUIDOT et al., 1993; FERNÁNDEZ-CHECA et al., 1998).

Segundo Oury et al. (1994) a Sod 3 é uma glicoproteína tetramérica com um peso molecular de aproximadamente de 135.000. Localiza-se no espaço extracelular e tem afinidade de ligação com proteoglicanos de sulfato e colágeno tipo I.

Srinivasan et al. (2000) afirmam que mutantes Sod1 Δ e Sod2 Δ mostram níveis de ferro, detectado por Ressonância Paramagnética de Elétron (EPR), de até cinco vezes maiores em relação aos níveis basais da linhagem selvagem isogênica, enquanto duplo mutante Sod1 Δ Sod2 Δ apresenta níveis de ferro superiores a nove vezes o encontrado para a selvagem, em condições aeróbias de crescimento. O tratamento da linhagem selvagem com um gerador de superóxido - paraquat, também aumentou o ferro detectável por EPR, indicando que o excesso de ferro livre pode ser devido aos efeitos deletérios do radical superóxido.

Para Longo et al. (1999), a simplicidade do cultivo e caracterização genética, as fases de crescimento características e controláveis, e sua marcante semelhança aos sistemas de estudo em eucariotos superiores, fazem da levedura um sistema modelo ideal para estudo de danos oxidativos e funções mitocondriais.

2.6 Bioensaio *Artemia salina*

Noldin et al. (2003) afirmam que a utilização de bioensaios para o monitoramento da bioatividade de extratos, frações e compostos isolados de plantas têm sido frequentemente incorporada à pesquisa fitoquímica. Dentre

estes ensaios biológicos, encontra-se o ensaio de toxicidade com *Artemia salina* (BST-Brine Shrimp Test).

Para Cavalcante et al (2000), o bioensaio de toxicidade com *A. salina* é em geral simples, rápido, sensível e baixo custo, e consiste na estimativa da concentração de uma substância através da medida de uma resposta biológica, na qual existe apenas um parâmetro envolvido: vida ou morte. O ensaio de letalidade permite a avaliação da toxicidade aguda e, portanto, é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica, sendo atualmente aceito pela comunidade científica.

Figura 4. *Artemia salina* Brine shrimp



Fonte: http://www.aquacare.de/produkte/pflege-zucht/e_kult_art.htm

Por ser amplamente utilizada como alimento vivo para peixes e outros crustáceos, seus ovos podem ser encontrados com facilidade em lojas de aquaristas. Além disso, os ovos não eclodidos são metabolicamente inativos, e podem ser conservados por longos períodos se mantidos desidratados e de preferência em vácuo e a baixas temperaturas. Quando reidratados, seus ovos eclodem em cerca de 24 horas, se em condições ambientais adequadas, chegando à fase adulta com 20 a 30 dias de vida. Esse ciclo de vida relativamente curto favorece seu uso em testes de toxicidade aguda e crônica (Siqueira et al., 2008).

CAPÍTULO 1: Estudo do potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo* do extrato aquoso das folhas de *Centratherum punctatum* spp *punctatum* Cass. (Asteraceae)

Artigo a ser submetido ao Journal of Biomedicine and Biotechnology

Estudo do potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo* do extrato aquoso das folhas de *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* Cass. (Asteraceae)

Daniella Fernandes de Carvalho^{1*}(PQ), George Laylson da Silva Oliveira²(IC), Alisson Ferreira Dantas¹ (PQ), Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante¹(PQ), Roseli Farias Melo de Barros¹(PQ)

1. Universidade Federal do Piauí – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
2. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí.

Resumo

O desbalanço entre a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e os antioxidantes, que são moléculas capazes de diminuir os efeitos nocivos gerados pelas EROS, pode resultar em condições patogênicas. Os antioxidantes podem colaborar na prevenção desse processo por meio da diminuição da injúria celular oxidativa, aumento ao estímulo de sistemas de defesa celular e proteção da oxidação do DNA, além da inibição da apoptose em células de órgãos vitais. *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* Cass. (Asteraceae), popularmente conhecida como perpétua-roxa, é utilizada na medicina tradicional como antioxidante, antimicrobiana e antiproliferativa. Este estudo buscou realizar a triagem fitoquímica do extrato aquoso das folhas de *C. punctatum*, quantificar o teor de compostos fenólicos e flavonóides, avaliar a atividade antioxidante *in vitro* através dos métodos dos radicais DPPH e ABTS, além de avaliar as possíveis atividades tóxicas em *Artemia Salina* L.; oxidantes, protetora, antioxidantes e de reparo do extrato, frente aos danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em *Saccharomyces cerevisiae* nas concentrações de 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL em pré, co e pós-tratamento. A CL₅₀ do extrato aquoso de *C. punctatum* foi de 3697,57µg/mL. A análise da prospecção fitoquímica do extrato indicou a presença de importantes metabólitos secundários para tratamentos medicinais como flavonóides e taninos. Os compostos fenólicos presentes no extrato foram de 3775,48 ± 8,60 mg mg EAG/g AM e os flavonóides encontrados foram de 2131,15 ± 40,98 mg ER/g MS. A análise antioxidante mostrou que o extrato aquoso tem capacidade de reduzir os radicais DPPH• e ABTS•+ em todas as concentrações testadas. O extrato não apresentou ação oxidante frente às linhagens testadas e protegeu as linhagens contra os danos induzidos pelo H₂O₂. No co-tratamento, todas as concentrações do extrato apresentaram atividade antioxidante. Atividades de reparo também foram observadas em todas as concentrações testadas. O extrato testado apresenta-se como uma fonte natural de compostos antioxidantes e pode ser usado, especialmente, para formulações farmacológicas que venham minimizar os efeitos do estresse oxidativo.

Palavras-chave: Antioxidantes; *Saccharomyces cerevisiae*; *Centratherum punctatum*; fitoquímica; compostos fenólicos.

1 - Introdução

As Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) são continuamente produzidas pelo corpo humano a partir do consumo de oxigênio durante a respiração e a partir de algumas funções imunológicas mediadas por células (OGA, 2003). As EROs abrangem moléculas conhecidas como Radicais Livres (RL), que possuem um ou mais elétrons desemparelhados, sendo, por isso, moléculas altamente instáveis, que tendem a oxidar moléculas biológicas, tais como ácidos nucleicos, lipídios, proteínas, ácidos graxos poliinsaturados e carboidratos para atingirem a estabilidade (ARIVAZHAGAN et al., 2001).

Existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes por serem substâncias que em pequenas quantidades podem prevenir e apresentar alto potencial terapêutico de doenças causadas por radicais livres (NOGUCHI & NIKI, 2000). É sabido que as plantas que possuem propriedades antioxidantes e farmacológicas estão relacionadas com a presença de compostos fenólicos, especialmente ácidos fenólicos e flavonóides (GÜLÇIN, 2012).

Substâncias com essas propriedades podem proteger as células contra os efeitos danosos causados por EROs, tais como oxigênio singlete, superóxido e radicais peroxila, hidroxila e espécie reativa de nitrogênio como peroxinitrito (ORHAN et al., 2009). O desequilíbrio entre a formação e a remoção destas substâncias no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos devido a menor formação ou ao maior consumo, ou do aumento da geração de radicais livres, gera um estado pró-oxidante denominado estresse oxidativo que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares (TIRAPEGUI, 2006).

A família Asteraceae é conhecida pelas propriedades terapêuticas, cosméticas e aromáticas. Já é relatado na literatura o uso medicinal de representantes dessa família como antihelmíntico, antiinflamatório, adstringente, colestérico, antihemorrágico, antimicrobiano, diurético, analgésico e antiespasmódico (PORTILLO et al., 2001; ISCAN et al., 2006; ABAD & BERMEJO, 2007; BENEDEK et al., 2007; JEON et al., 2008).

Os compostos fenólicos citados anteriormente como antioxidantes são encontrados em grande quantidade na família Asteraceae, mais especificamente em *Centratherum punctatum* spp *punctatum* Cass.,

popularmente conhecida como perpétua-roxa e utilizada na medicina tradicional como antioxidante, antimicrobiana e antiproliferativa (BEVELLE et al., 1981; NISHA et al., 2007; ANI et al., 2008).

Apesar dos relatos acerca das propriedades farmacológicas de *C. punctatum*, ainda existe a necessidade de mais estudos para averiguar suas atividades biológicas, bem como estudos que relatem suas análises fitoquímicas, bioquímicas, microbiológicas, e especialmente antioxidantes em sistemas *in vitro* e *in vivo*.

A avaliação da capacidade antioxidante, empregando animais de laboratório é, em geral, de difícil execução e necessita de um número elevado de animais para assegurar resultados estatisticamente significativos. Já os ensaios realizados com microrganismos são fáceis, rápidos e podem utilizar um grande número de células com as mesmas características genéticas (SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR, 2005).

O desenvolvimento de novos métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante ou quantificação de antioxidantes específicos em matrizes complexas como extratos vegetais, frutas e alimentos em geral, pode ser justificado pela relevância comercial e farmacológica destes aditivos, bem como pela necessidade de metodologias mais simples e baratas (PALANISAMY et al., 2011).

A levedura eucariótica *Saccharomyces cerevisiae* é amplamente utilizada na triagem biológica e testes para prever a capacidade antioxidante de diversos compostos. Tal como acontece com todos os aeróbios, *S. cerevisiae* possui uma variedade de defesas antioxidantes, incluindo enzimas superóxido dismutase (Sod) e Catalase (Cat) (MARRES et al., 1985), e seu metabolismo é semelhante ao de eucariotos superiores, com mecanismos próprios de ativação metabólica (citocromo P450) e de detoxificação, que não estão presentes em bactérias (HENRIQUES et al., 2001).

Diante do exposto e considerando a complexidade química do extrato aquoso de *C. punctatum*, este trabalho teve como objetivos realizar a investigação fitoquímica, quantificar o teor de compostos fenólicos e flavonóides presentes, avaliar as possíveis atividades tóxicas de *C. punctatum* em *Artemia salina*, avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* através do teste do radical livre DPPH e ABTS, bem como avaliar a capacidade

oxidante/antioxidante, protetora e reparadora do extrato frente aos danos causados pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂), utilizando linhagens de *S. cerevisiae* proficientes e deficientes em defesas para enzimas antioxidantes.

2- Materiais e Métodos

2.1 - Procedimentos experimentais gerais

Utilizou-se solventes e reagentes usados eram analiticamente puros. O reagente Folin-Ciocalteu e a rutina foram adquiridos da Merck, o radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) da Sigma-Aldrich e o ácido gálico da Vetec. As medidas de absorção foram feitas usando espectrofotômetro UVVis Hytachi U-3000.

2.2 - Material vegetal

Centratherum punctatum ssp *punctatum* Cass. foi coletada e herborizada seguindo-se metodologia proposta por Mori et al. (1989) em Teresina/PI, em junho de 2012. A identificação botânica da espécie vegetal foi realizada pela Profa. Dra. Roseli Farias Melo de Barros e exsicatas foram depositadas no acervo do Herbário Graziela Barroso (TEPB) da Universidade Federal do Piauí.

2.3 - Preparação dos extratos

Para a preparação do extrato aquoso bruto (EAB), folhas de *C. punctatum* Cass. (71,6 g) foram secas a temperatura ambiente e depois reduzidas a pó. O pó foi exaustivamente extraído por infusão a 80°C por 30 minutos com 500 mL de água destilada. A água foi evaporada até à secagem sob pressão, reduzida em evaporador rotativo até obtenção de 14,36 g do EAB (20,06%).

2.4 - Investigação Fitoquímica

Para a avaliação dos principais grupos fitoquímicos presentes no extrato, foram realizados testes para a detecção de flavonóides, alcalóides, saponinas, taninos (hidrolisáveis e condensados), esteróides/triterpenóides, cumarinas e derivados antraquinônicos, de acordo com a metodologia de Barbosa (2004) e Matos (2009).

2.5 - Determinação de fenóis totais

A quantificação do teor de compostos fenólicos (FT) presentes nos extratos aquoso das folhas de *C. punctatum* foi determinado pelo método de Folin e Ciocalteu com modificações (BONOLI et al., 2004).

Uma curva analítica foi construída utilizando o ácido gálico, dissolvido em metanol, no intervalo de concentrações 0,1 a 2,5 mg L⁻¹. Alíquotas de 100 µL da solução metanólica das amostras (1000 mg L⁻¹) foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL. Em seguida, adicionaram-se 500 µL do reagente de Folin- Ciocalteu, 6 mL de água destilada e agitou-se por 1 minuto. Adicionaram-se 2 mL de Na₂CO₃ (15%) e agitou-se por 30 segundos. Completou-se o volume dos balões volumétricos com água destilada. Preparou-se um “branco” concomitante. As absorbâncias das amostras foram medidas após duas horas de reação, no comprimento de onda ($\lambda_{\text{máx}}$) 750 nm (SOUSA et al., 2007).

Os teores de fenóis totais (FT) foram determinados usando a curva analítica de ácido gálico e os valores foram expressos em miligrama de equivalente de ácido gálico por grama de amostra (mg EAG/g AM). A equação da reta foi $Y = 0,121X - 0,011$, onde Y é a absorbância e X a concentração, com coeficiente de correlação linear $R = 0,9819$. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

2.6 - Flavonóides totais

O teor de flavonóides totais (FLAT) no extrato aquoso das folhas de *C. punctatum* foi determinado por espectrofotometria de absorção molecular utilizando solução metanólica de cloreto de alumínio (AlCl₃) (PEIXOTO et al., 2010).

Foi construída uma curva analítica utilizando soluções de rutina dissolvidas em MeOH/H₂O (7:3) nas concentrações de 1-25 (1,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0) µg/mL. Foi ainda preparada solução metanólica de AlCl₃ (50 mg/mL) e soluções estoques das amostras dissolvendo-se 50 mg do extrato em um balão volumétrico (50 mL) com MeOH obtendo-se a concentração de 1000 µg/mL. Uma alíquota de 300 µL desta solução foi transferida para balões

de 10 mL e acrescido 240 µL de ácido acético, 4 mL da solução metanólica de piridina 20% e 1 mL do reagente de AlCl₃ (50 mg/mL). Em seguida, a solução teve seu volume acertado para 10 mL com água destilada. Preparou-se o branco em paralelo. Após 30 minutos de reação, a absorvância das amostras foi medida a 420 nm.

O teor de flavonóides totais (FLAT) foi expresso em miligramas de equivalente de rutina por grama de amostra (mg ER/g AM). A equação da reta obtida foi: $Y = 0,0122 X - 0,004$, onde Y é a absorvância e X a concentração, com um coeficiente de correlação linear de $R = 0,999$. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.7 - Avaliação da toxicidade em *Artemia salina* L.

A toxicidade sobre *A. salina* foi realizada através da adaptação da metodologia de Meyer et al. (1982), preparando-se uma solução com sal marinho na concentração de 35 g/L. O pH foi ajustado entre 8,0 e 9,0, por meio de solução 0,1 mol/L de NaOH. Esta solução foi utilizada para eclosão dos ovos de *A. salina* e no preparo das demais diluições. Os ovos foram colocados para eclodir na solução salina por 48 horas, com aeração constante a 25 °C. Cerca de dez larvas da espécie foram transferidas para tubos de ensaio contendo a solução salina e amostras a serem testadas, nas seguintes concentrações do extrato aquoso: 50, 100, 150, 250, 500 e 1000 µg/mL. Uma solução de solução salina foi usada para controle negativo. O ensaio foi realizado em triplicata de amostras, sendo a contagem dos animais mortos e vivos realizada após 24 horas com o auxílio de lupas microscópicas. O número de indivíduos mortos foi avaliado de acordo com a equação segundo Abbott (1925), sendo a CL₅₀ determinada por análise probit, através do software SPSS 17 com 95 % de índice de confiança.

2.8 - Atividade antioxidante pelo método do radical DPPH

Foi utilizada a metodologia descrita por Silva et al. (2005) com algumas modificações. Preparou-se uma solução inicial do extrato aquoso das folhas de *C. punctatum* (1000 µg/mL) e dos padrões utilizados (quercetina, rutina e ácido

gálico) e realizadas diluições para obtenção de concentrações finais de 1000, 500, 250, 150, 100 e 50 µg/mL. As medidas das absorvâncias das misturas reacionais (0,3 mL da solução da amostra ou do controle positivo e 2,7 mL da solução estoque de DPPH• na concentração de 40 µg/mL), foram realizadas em triplicatas a 517 nm (nanômetros) para o extrato e controles no tempo 30 minutos. Uma mistura de etanol (2,7 mL) e extrato (0,3 mL) foi utilizada como branco.

Os valores de absorvância nas concentrações de 1000, 500, 250, 150, 100 e 50 µg/mL, no tempo de 30 minutos foram convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (AA%), determinados pela equação proposta por Huang et al. (2005) e Tepe e Sokmen (2007):

$$\%AA = \frac{[Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})] \times 100}{Abs_{controle}}$$

onde, Abs_{controle} é a absorvância inicial da solução etanólica de DPPH e Abs_{amostra} é a absorvância da mistura reacional (DPPH + amostra). A concentração eficiente (CE₅₀) do extrato necessária para reduzir o radical DPPH• em 50%, foi determinada por regressão Probit (LOCATELLI et al., 2009).

Os resultados foram analisados estatisticamente, utilizando-se o programa Graphpad Prism 5.0, com análise de variância (ANOVA) e aplicação do teste de Tukey de múltiplas comparações com significância para valores de significância *** (P<0,001), ** (P<0,01) e * (P<0,05).

2.9 - Atividade antioxidante pelo método do radical ABTS

Para a determinação da atividade antioxidante pelo método de redução do radical ABTS•+, usou-se a metodologia descrita por Re et al., (1999). Inicialmente, formou-se o radical ABTS•+, a partir da reação de 5 mL de uma solução 7 mM de ABTS•+ com 88µL de uma solução 2,45 mM de persulfato de potássio (K₂S₂O₈), incubada à temperatura ambiente e na ausência de luz por 16 horas. Transcorrido esse tempo, a solução de ABTS•+ foi diluída em etanol até obter-se uma solução com absorvância de 0,70 (± 0,05), a 734 nm.

Preparou as concentrações finais em triplicata do extrato e dos padrões de 1000, 500, 250, 150, 100 e 50 µg/mL.

A partir do extrato obtido de suas folhas, preparou-se a mistura reacional do extrato com o cátion radical ABTS•+. Em ambiente escuro, foi transferida uma alíquota de 40 µL de cada concentração do extrato e dos padrões para tubos de ensaio com 1960 µL do radical ABTS•+, realizou-se a leitura da absorbância nos tempos de 1, 4 e 6 minutos da mistura reacional em um espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em média de três repetições (n=3), seguidos do desvio padrão do TEAC (Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox) e comparado ao TEAC dos controles ácido gálico, rutina e quercetina.

Os resultados foram analisados estatisticamente, utilizando-se o programa Graphpad Prism 5.0, com análise de variância (ANOVA) e aplicação do teste de Tukey de múltiplas comparações com significância para valores de significância *** (P<0,001), ** (P<0,01) e * (P<0,05).

2.10- Teste com *Saccharomyces cerevisiae*

2.10.1 – Linhagens

As linhagens de *S. cerevisiae* com seus genótipos relevantes, utilizadas no ensaio de atividade antioxidante estão mostradas no Quadro 1. A linhagem EG118 é defectiva no sistema enzimático que envolve a enzima superóxido dismutase citoplasmática (CuZnSOD - produto do gene Sod 1), enquanto a EG110 o é na Sod mitocondrial (MnSOD - produto do gene Sod 2).

A linhagem EG133 é o duplo mutante, defectivo para Sod 1 e Sod 2 e EG103 corresponde a linhagem selvagem, portanto proficiente nestas enzimas. EG223 corresponde a linhagem mutada na enzima catalase, enquanto EG corresponde a linhagem mutada, tanto na Sod citoplasmática, quanto na enzima catalase (GRALLA; VALENTINE, 1991). As linhagens utilizadas foram gentilmente cedidas pelo grupo de pesquisa em Genética Toxicológica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Quadro 1. Descrição das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* usadas no estudo. Adaptado Gasparri, 2005.

DESCRIÇÃO	GENÓTIPO	ORIGEM
EG103 (SOD WT)	MATa leu2-3 trp1-289 ura2-52 GAL+	Edith Gralla, L Angeles
EG118 (Sod1Δ)	Sod1::URA2 all other markers as EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG110 (Sod2Δ)	Sod2:: TRP1 all other markers as EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG133 (Sod1ΔSod2Δ)	Sod1:: URA3 Sod2::TRP1 double mutant all other markers as EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG223 (Cat1Δ)	EG103, except Cat1:: TRP1	Edith Gralla, L Angeles
EG (Sod1ΔCat1Δ)	EG103, except Sod1:: URA3 and Cat1: TRP1	Edith Gralla, L Angeles

2.10.2 – Meios de cultura

O crescimento das células foi feito em meio líquido completo (YEL), contendo 1% de extrato de levedura, 2% de bactopectona e 2% de glicose. Foram feitas sementeiras em meio sólido YEPD, que foi preparado adicionando-se à composição do meio YEL 2% de bacto-ágar.

2.10.3 Avaliação da capacidade oxidante, antioxidante e de reparo do extrato aquoso das folhas de *C. punctatum* ssp *punctatum* Cass. em *S. cerevisiae* frente aos danos do peróxido de hidrogênio.

As concentrações do extrato aquoso das folhas de *C. punctatum*, utilizadas neste estudo, foram de 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL.

As linhagens foram cultivadas em meio YEL a 28°C em um agitador orbital até atingirem a fase de crescimento estacionária, de acordo com Rosa et al. (2006). Células em suspensão foram semeadas a partir do centro para a margem de uma placa de Petri em um ciclo contínuo, para ambos os lados da placa contendo no centro um disco de papel filtro estéril no qual foi adicionado 100 µL das concentrações do extrato e 10 µL de H₂O₂ (10 mM), utilizado no estudo como agente estressor (co-tratamento). Para avaliação dos efeitos do extrato frente aos danos induzidos pelo H₂O₂ em *S. cerevisiae* foi organizado o desenho para o experimento contido na Tabela 1.

Tabela 1. Desenho dos experimentos para a avaliação dos efeitos do extrato aquoso das folhas de *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* Cass. frente aos danos induzidos pelo H₂O₂ em *Saccharomyces cerevisiae*

TRATAMENTO	POSSÍVEL MECANISMO DE MODULAÇÃO	PROCEDIMENTO
Pré-tratamento	Reação intracelular	100 µL do extrato no disco central/ 4 hs na estufa a 30 °C/ 10 µL de H ₂ O ₂ 10 mM/ estufa a 30°C por 48 hs
Cotratamento	Reação extracelular	100 µL do extrato e 10 µL de H ₂ O ₂ 10 mM no disco central/ estufa a 30 °C por 48 hs
Pós-tratamento	Efeito sobre o reparo do DNA	10 µL de H ₂ O ₂ 10 mM no disco central / 4 hs na estufa a 30 °C/adiciono de 100 µL dos extrato no disco central/ estufa a 30 °C por 48 hs
Controle Positivo (H ₂ O ₂)	Reação Intracelular	10 µL de H ₂ O ₂ 10 mM no disco central/ estufa a 30 °C por 48 hs
Controle Negativo (Salina 0,9%)	Sem reação	100 µL de Salina 0,9% no disco central/ estufa a 30 °C por 48 hs

Adaptado de JAARSMA et al. (2001)

Para a determinação da atividade antioxidante 2×10^7 células/mL provenientes da fase estacionária de crescimento, foram tratadas com os extratos em presença do peróxido de hidrogênio. Para avaliação do pré-tratamento, os extratos foram adicionados ao disco e, quatro horas depois, adicionou-se o peróxido de hidrogênio. No pós-tratamento adicionou-se, primeiramente, o peróxido de hidrogênio e quatro horas após, adicionou-se o extrato. Após 48 horas de incubação em estufa a 30 °C, mediu-se o halo de inibição do crescimento, sendo estes resultados tabelados e submetidos a tratamento estatístico.

A inibição do crescimento leveduriforme foi medida em milímetros desde a margem do disco de papel-filtro para o início do crescimento celular. Os valores podem variar de 0 mm (crescimento completo) a 40 mm (ausência de crescimento), sendo este o tamanho da placa de Petri. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

2.10.4 Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente, utilizando-se o programa Graphpad Prism 5.0, com análise de variância (ANOVA) e aplicação do teste de Tukey de múltiplas comparações com significância *** (P<0,001), **

($P < 0,01$) e * ($P < 0,05$), comparando-se os tratamentos em teste com o controle negativo (Rutina 50 μ g/mL) e com o controle positivo (H_2O_2) utilizados.

3 – Resultados e Discussão

3.1 Triagem Fitoquímica

A triagem fitoquímica das amostras das folhas de *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* Cass. revelou a presença de flavonóides, polifenóis e taninos através dos testes qualitativos (Tabela 2), corroborando com os dados apresentados por Arumugam e Pawar (2011), que citaram a presença de flavonóides, taninos e glicosídeos cardiotônicos.

Tabela 2. Principais grupos fitoquímicos identificados no extrato aquoso das folhas de *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* Cass. coletados na cidade de Teresina/PI.

Grupo Fitoquímico	Teste Qualitativo	Resultado
Saponinas	Teste da espuma	-
Esteróides e Triterpenóides	Reação de Liebermann-Buchard	-
Alcalóides	Reação de Dragendorff e Bertrand	-
Flavonóides	Reação de Shinoda	+
Taninos e Polifenóis	Cloreto Férrico 1%	+
Cumarinas	NaOH/Ethanol, UV	-
Derivados antraquinônicos	Reação com NH_4OH	-

Legenda: (+) Presente; (-) Ausente.

Fabri et al. (2011) relataram em estudo sobre a composição fitoquímica na família Asteraceae, onde a maioria das espécies apresentou em sua composição compostos fenólicos como flavonóides (82%) e taninos (82%). Além desses, foram encontrados alcalóides (64%), triterpenos (36%), esteróides (64%), cumarinas (45%) e antraquinonas (27%).

Segundo Farnsworth (1966) o conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes a única opção terapêutica para muitas comunidades e grupos étnicos. Cita ainda que o conhecimento sobre o uso popular e eficácia de plantas medicinais contribuem significativamente para a difusão de propriedades terapêuticas das plantas. A triagem fitoquímica é capaz de fornecer a melhor opção de escolha do material a ser estudado e nos dá a possibilidade de adaptar as técnicas de fracionamento de extratos, isolamento e caracterização de substâncias puras, de acordo com os constituintes anteriormente detectados por testes qualitativos.

Para Ferguson (2001), compostos polifenólicos, como fenóis e flavonóides são componentes importantes de plantas com significativa atividade antioxidante e uma grande variedade de atividades biológicas, incluindo antibacteriana, anti-inflamatória, analgésica e antialérgica. Estes compostos têm sido indicados em vários estudos como varredores de radicais livres contra íons superóxido e hidroxilas e assim importantes na prevenção de doenças associadas com o dano oxidativo de membranas, proteínas e DNA (OYEDEMI; AFOLAYAN, 2011).

Yokozawa et al. (1993) e Dharmananda (2003) relataram que a presença de taninos em extratos de plantas indica o uso etnomedicinal desses extratos no tratamento de várias doenças. Referem ainda, que vários investigadores relataram a importância de taninos para a prevenção e tratamento do câncer, tratamento de tecidos ulcerados, na inibição da oxidação de lipídios, atividades antibacterianas e melhoria de funções renais. Assim, a quantidade deste metabólito secundário no extrato aquoso das folhas de *C. punctatum* indica a sua contribuição na atividade antioxidante e a sua possível utilização como planta medicinal.

3.2 - Fenóis totais e Flavonóides totais

Os teores de compostos fenólicos dos extratos determinados pelo método Folin-Ciocalteu expressos em mg EAG/g. Para o extrato aquoso das folhas de *C. punctatum*, os teores de compostos fenólicos variaram 3775,48 + 8,60 mg mg EAG/g AM.

A técnica mais utilizada para a quantificação espectrométrica de compostos fenólicos é a que utiliza o reagente Folin-Ciocalteu. O reagente consiste numa mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstístico, onde o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6+ (cor amarela no complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Na presença de certos agentes redutores, como as substâncias fenólicas, formam-se os complexos molibdênio-tungstênio azuis $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)_4]$, com estado de oxidação médio entre 5+ e 6+, o que permite determinar a concentração das substâncias redutoras que necessariamente não precisam ter natureza fenólica (OLIVEIRA et al., 2009).

Segundo Rufino et al. (2010) o teor de polifenóis pode ser classificado em três categorias: baixo (< 1 mg EAG/g), médio (1 – 5 mg EAG/g) e alto (> 5 mg EAG/g) para amostras baseadas em material vegetal fresco (MF) e baixo (< 10 mg EAG/g), médio (10 – 50 mg EAG/g) e alto (> 50 mg EAG/g), baseadas em material vegetal seco (MS). Seguindo esta classificação dada em mg EAG/g, o extrato aquoso das folhas de *C. punctatum* apresenta altos teores de polifenóis.

Os flavonóides exercem uma função fundamental na defesa antioxidante, minimizando a peroxidação lipídica e o efeito dos radicais livres prevenindo doenças como a arteriosclerose, as enfermidades coronárias e câncer.

Desde a década de 60, o AlCl_3 vem sendo largamente empregado como reagente de desvios químicos em espectroscopia no UV-Vis na identificação estrutural de flavonóides (MABRY et al., 1970; MARKHAM, 1982). Na sua quantificação espectrofotométrica com solução metanólica de AlCl_3 ocorre a formação de complexo flavonóide. As medidas das absorbâncias das amostras são feitas no $\lambda = 420$ nm, no qual não há interferência de outras substâncias fenólicas, como os ácidos fenólicos que estão presentes nos tecidos vegetais juntamente com os flavonóides.

Os valores da quantificação dos flavonóides totais extrato aquoso das folhas de *C. punctatum* foi de $2131,15 \pm 40,98$ mg ER/g MS.

3.3 Toxicidade em *Artemia salina* L.

Segundo Meyer et al. (1982) o grau de toxicidade e a dose letal média, DL_{50} , apresentada por extratos e frações de plantas sobre larvas de *A. salina*, são: $DL_{50} \geq 1000 \mu\text{g/mL}$ são atóxicos, entre $500 \leq DL_{50} \leq 1000 \mu\text{g/mL}$ baixa toxicidade e $DL_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$ altamente tóxico. A CL_{50} do extrato aquoso testado frente à mortalidade de *A. salina* foi estipulada para 3967,57 $\mu\text{g/mL}$, logo o extrato não apresenta toxicidade frente ao teste realizado (Tabela 3).

Tabela 3. Valor da CL_{50} do extrato aquoso das folhas de *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* Cass. com o intervalo de confiança de 95%.

Amostra	CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Intervalo de Confiança de 95%	
		Limite inferior ($\mu\text{g/mL}$)	Limite superior ($\mu\text{g/mL}$)
Extrato aquoso	3967,57	1519,54	5522897868

Os testes de toxicidade devem ser considerados como análises indispensáveis no biomonitoramento de extratos de plantas. O teste de toxicidade com *A. salina* é muito utilizado por ser rápido, sensível, simples, baixo custo e não precisa de muitos equipamentos para a realização do teste (MEYER, 1982; LUNA et al., 2005; RUEBHART et al., 2008; MARCO et al, 2012, RAKSHIT et al, 2012).

Vários trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre *A. salina* com atividades antifúngica, viruscida, antimicrobiana, tripanossomicida e parasiticida. Este bioensaio também tem sido citado na avaliação prévia de extratos de plantas com possível atividade antitumoral e está sendo utilizado para estudo biológico inicial de um grande número de amostras para detecção simultânea de toxicidade e fototoxicidade (MEYER et al., 1982)

3.4 Atividade antioxidante pelo método do radical DPPH

Semelhante ao encontrado em experimentos anteriores realizados por Arumugam e Pawar (2011), onde a avaliação antioxidante realizada *in vitro* dos resíduos de folhas de *C. punctatum* mostrou atividade antioxidante significativa

nas concentrações entre 210 µg/mL a 353 µg/mL, o extrato aquoso das folhas de *C. punctatum* Cass. foi capaz de reduzir o radical DPPH•, através do decréscimo dos valores da absorbância, apresentando atividade antioxidante significativa na concentração de 1000 µg/mL quando comparado ao controle rutina (Tabela 4). A alta capacidade de captura do radical DPPH apresentado pelo extrato na concentração de 1000 µg/mL está relacionada com seu alto teor de compostos fenólicos. Considerando a CE₅₀ do extrato, observa-se que nenhuma fração foi tão eficiente quanto os padrões utilizados para comparação.

Tabela 4. Avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso das folhas de *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* Cass. coletados na cidade de Teresina/PI, pelo método de redução do radical DPPH•

Amostras	Redução do DPPH ^a (%)						
	Concentração (µg/ml)						
	50	100	150	250	500	1000	CE ₅₀
Extrato aquoso	12,53±1,20 b***c***	14,29±0,70 a***b*** c***	16,12±1,2 9 a***b*** c***	27,14±4,2 2 a***b***c* **	52,16±5,3 0 a*** b*** c***	83,42±2,1 8 b*** c***	414,86
Rutina	19,51±4,93	35,37±2,35	51,57±1,7 2	74,54±3,1 6	85,04±0,5 1	87,73±0,5 1	143,93
Quercetina	63,31±3,00	90,05±0,54	91,43±0,9 5	91,15±0,2 4	91,67±0,2 9	92,22±0,1 8	7,33
Acido Gálico	90,77±0,83	92,95±0,10	93,19±0,0 6	93,71±0,1 5	93,95±0,4 7	93,78±2,3 3	0,001

Foi utilizado ANOVA com teste de Tukey para valores de significância *** (P<0,001), ** (P<0,01) e * (P<0,05). Sendo "a" a significância em relação a rutina, "b" em relação a quercetina e "c" em relação ao ácido gálico.

O DPPH• é um radical livre estável, de cor violeta, com banda de absorção em solução metanólica centrada em 517 nm e o método utilizando esse radical foi proposto inicialmente por Blois (1958). Neste ensaio, o antioxidante reage com o radical DPPH•, convertendo-o em sua forma reduzida. Nesta reação, a solução metanólica de DPPH•, inicialmente de coloração violeta, torna-se descolorida e o grau desta descoloração indica a habilidade do antioxidante em sequestrar o radical livre (MOLYNEUX, 2004).

Segundo Joon-Kwan e Takayuki (2009), o teste DPPH• é simples, sensível e mede a capacidade de uma substância potencialmente antioxidante de sequestrar o radical livre DPPH•, que em solução etanólica apresenta

coloração violeta. A atividade antioxidante é avaliada pelo monitoramento do decréscimo da absorbância, sendo esta proporcional à concentração de substâncias antioxidantes presentes na amostra testada (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; RONALD et al. 2005; LIM et al., 2007; GOULART et al., 2009).

Huang et al. (2005) relataram que a acessibilidade estérica de radical DPPH• é um determinante importante para a reação, uma vez que pequenas moléculas têm melhor acesso ao radical, apresentam capacidade antioxidante relativamente mais elevada. Por outro lado, grandes moléculas antioxidantes que reagem rapidamente com os radicais peróxila podem reagir lentamente ou pode mesmo ser inerte neste ensaio. A inexistência do radical DPPH• ou radicais semelhantes em sistemas biológicos é também uma lacuna a ser estudada para uma melhor correlação entre a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*. Também foi relatado pelos mesmos autores que a reação de DPPH com eugenol foi reversível. Isso poderia resultar em leituras falsamente baixas de capacidade antioxidante de amostras contendo eugenol e outros fenóis com estrutura semelhante

3.5 Atividade antioxidante pelo método do radical ABTS

Para análise do potencial antioxidante pelo método do ABTS•+ obteve-se o TEAC do extrato aquoso das folhas de *C. punctatum* Cass. comparado ao padrão ácido gálico, quercetina e rutina (Tabela 5).

Nos tempos de 1, 4 e 6 minutos, observou-se que os valores do TEAC do extrato aquoso testado foram inferiores ao TEAC dos controles positivos rutina, quercetina e ácido gálico, indicando pouca atividade antioxidante. Substâncias com capacidade antioxidante são consideradas ativas quando os seus valores de TEAC são próximos aos da rutina e quercetina (RE et al., 1999).

Tabela 5. Avaliação da atividade antioxidante equivalente ao Trolox do extrato aquoso das folhas de *Centratherum punctatum ssp punctatum* Cass. coletados na cidade de Teresina/PI.

Amostras	ABTS ^{•+} (TEAC, mM Trolox)		
	1 min	4 min	6 min
Extrato aquoso 1	0,35 ± 0,04 a*** b*** c***	0,42 ± 0,42 a*** b*** c***	0,45 ± 0,02 a*** b*** c***
Acido Gálico	8.01 ± 0.23	13.05 ± 0.45	13.60 ± 0.37
Quercetina	3.05 ± 0.48	5.04 ± 0.35	5.38 ± 0.31
Rutina	1.27 ± 0.05	1.34 ± 0.03	1.35 ± 0.07

Foi utilizado ANOVA com teste de Tukey para valores de significância *** (P<0,001), ** (P<0,01) e * (P<0,05). Sendo “a” a significância em relação a rutina, “b” em relação a quercetina e “c” em relação ao acido gálico.

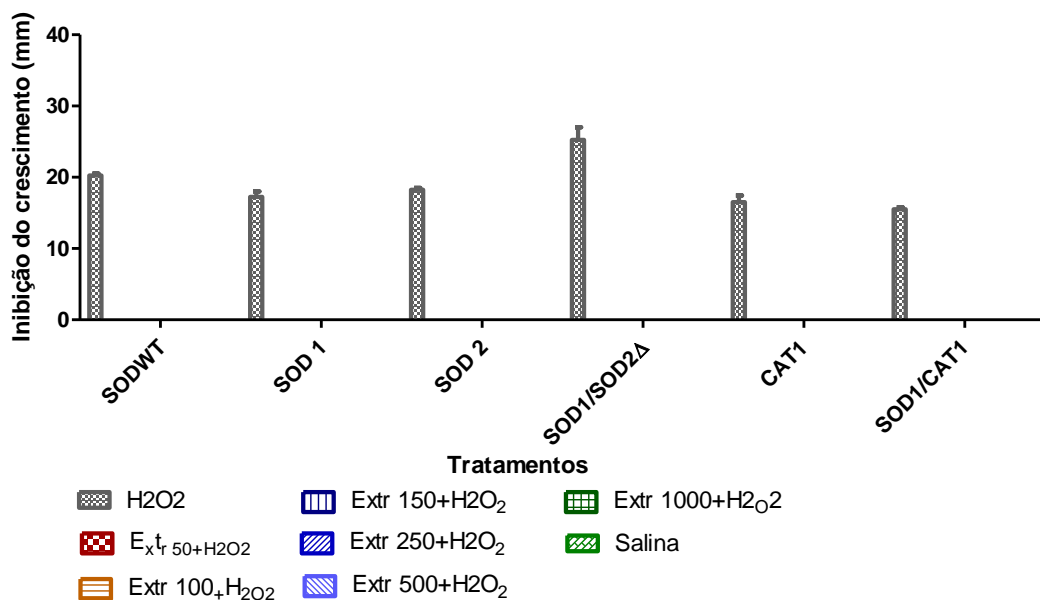
Para Magalhães et al. (2008) este ensaio espectrofotométrico é tecnicamente simples, o que contribui para a sua aplicação para em determinações de triagem e de rotina. A varredura do radical ABTS^{•+} pode ser avaliada através de uma ampla gama de pH, que é útil para estudar o efeito do pH nos mecanismos da atividade antioxidante. Além disso, o radical ABTS^{•+} é solúvel em água e solventes orgânicos, permitindo a determinação da capacidade antioxidante de compostos hidrofílicos e lipofílicos. Além disso, este ensaio tem sido criticado por não ser representativo para a avaliação da atividade antioxidante de biomoléculas.

.3.6 Teste com *Saccharomyces cerevisiae*

3.6.1 Avaliação da ação oxidante dos extratos aquoso das folhas de *Centratherum punctatum ssp punctatum* Cass. em *Saccharomyces cerevisiae*

Em *S. cerevisiae* proficientes e mutadas em defesas antioxidantes, os extratos aquosos das folhas de *C. punctatum* não apresentaram efeitos oxidantes nas concentrações testadas para as linhagens SOD WT, SodΔ1, Sod2Δ, Sod1Δ/Sod2Δ, Cat1Δ, Sod1Δ/Cat1Δ, pois os dados para inibição de crescimento das linhagens usadas no teste do disco central, não foram estatisticamente significantes em relação ao controle negativo (Figura 1).

Figura 1. Avaliação oxidante do extrato aquoso das folhas de *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* Cass. em *Saccharomyces cerevisiae* pela inibição de crescimento no teste do disco central. Extratos nas concentrações 50, 100, 150, 250, 500 e 1000 µg/mL. *** Dados significantes (P<0,0001) em ANOVA e testes Tukey's, para o H₂O₂ em relação ao controle negativo (solução salina).



O modelo de resposta citotóxica em *S.cerevisiae*, através do teste de inibição de crescimento é uma estratégia simples e muito sensível para avaliação do efeito biológico de substâncias naturais e sintéticas em tratamentos diversos (Rosa et al., 2004).

Em concordância com os achados durante a triagem fitoquímica (Tabela 2), o extrato aquoso de *C. punctatum* exibe entre seus principais metabólitos secundários a presença de compostos fenólicos que podem lhe conferir essa atividade protetora contra o estresse oxidativo. Pois de acordo com Stasiuk e Kozubek (2010), os compostos fenólicos são eficientes protetores não enzimáticos contra o estresse oxidativo, podendo agir impedindo que os íons de metais de transição iniciem a oxidação, ou inibindo enzimas pró-oxidantes. Entretanto, cada organismo-teste apresenta peculiaridades em relação à avaliação de produtos tóxicos, citotóxicos e antioxidantes, apesar de boas correlações desses biomarcadores com estudos em eucariotos, incluindo as leveduras e mamíferos.

3.6.2 Efeitos protetores dos extratos aquoso das folhas de *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* Cass. frente aos danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio em *Saccharomyces cerevisiae*

Todas as concentrações dos extratos protegeram as células leveduriformes dos danos a serem causados pelo H₂O₂ em *S. cerevisiae* em pré-tratamento, em todas as concentrações testadas de forma similar ao controle rotina usado no teste (Tabela 6).

Tabela 6. Atividade protetora do extrato aquoso das folhas de *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* Cass. observada frente aos danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio avaliadas pela inibição de halos em *Saccharomyces cerevisiae*.

Concentração (µg/mL)	Inibição do crescimento (mm)					
	Sod wt	Sod 1Δ	Sod 2Δ	Sod 1Δ/ Sod 2Δ	Cat 1Δ	Sod 1Δ/ Cat 1Δ
50	11.25±1.50 **a	11.75±0.95 ***a***b	14.25±4.78 ***a*b	11.00±0.81 ***a***b	12.25±2.87 *a	10.50±1.00 ***a*b
100	10.75±1.50 **a*b	10.25±1.89 ***a***b	13.50±4.04 ***a*b	10.00±0.81 ***a***b	11.75±.25 *a*b	9.25±0.95 ***a**b
150	9.75±1.71 ***a**b	10.00±1.15 ***a***b	11.25±1.50 ***a**b	9.50±0.57 ***a***b	12.00±0.81 *a	9.25±0.95 ***a**b
250	10.25±0.95 ***a**b	9.95±0.98 ***a***b	12.00±0.81 ***a**b	9.00±0.81 ***a***b	11.75±0.95 ***a*b	9.00±0.81 ***a**b
500	9.50±2.51 ***a**b	9.75±0.95 ***a***b	11.75±2.98 ***a**b	9.75±0.95 ***a***b	11.00±1.41 **a*b	8.75±0.95 ***a***b
1000	10.00±2.10 ***a**b	8.25±1.70 ***a***b	6.00±2.70 ***a***b	6.25±0.00 ***a***b	9.75±2.06 ***a**b	7.50±1.29 ***a***b
H₂O₂	16.75±1.26	28.00±7.25	25.25±6.18	24.50±1.00	19.00±1.15	17.00±1.82
Rutina	9.25±2.22 ***a***b	8.50±0.57 ***a***b	6.00±1.15 ***a***b	5.00±4.08 ***a***b	8.25±6.23 ***a***b	6.00±4.24 ***a***b

Médias ± desvio padrão das medidas (mm) dos halos formados pela inibição do crescimento das linhagens em relação às concentrações e substâncias testadas. Foi utilizado ANOVA com teste de Tukey com significância *** (P<0,001), ** (P<0,01) e * (P<0,05). Sendo "a" a significância em relação ao controle positivo (H₂O₂), "b" em relação ao controle negativo (salina).

As moléculas antioxidantes do extrato testado apresentaram uma versatilidade e um amplo espectro de detoxificação de ERO. Estas características peculiares são observadas com frequência nos antioxidantes não enzimáticos, como as vitaminas, os polifenóis, os retinóides e os compostos sulfurados. Desta forma, novamente pode-se atribuir uma ação protetora aos flavonóides presentes no extrato.

Dessa forma, apontamos que o extrato aquoso das folhas de *C. punctatum*, como observado nos dados da Tabela 6, pode ser usado como fonte de compostos naturais com efeitos quimiopreventivos em doenças

relacionadas ao estresse oxidativo, pois as lesões celulares ocasionadas por EROs têm sido implicadas no desenvolvimento e progressão de várias doenças, como referido por Alamed et al. (2009).

3.6.3 Avaliação antioxidante do extrato aquoso das folhas de *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* Cass. frente aos danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio em *Saccharomyces cerevisiae*

Excelentes atividades antioxidantes foram obtidas (Tabela 8) para o extrato em co-tratamento com H₂O₂, frente aos danos oxidativos induzidos por esse agente oxidante, sugerindo que os compostos presentes no extrato poderiam estar quelando espécies reativas de oxigênio, por interação direta e assim, substituindo e/ou reforçando algumas defesas antioxidantes celulares. É interessante notar que não foi verificada ação pró-oxidante, mesmo em altas doses do extrato empregado.

Tabela 7. Atividade antioxidante do extrato aquoso das folhas de *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* Cass. observada frente aos danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio avaliadas pela inibição de halos em *Saccharomyces cerevisiae*.

Concentração (µg/mL)	Sod wt	Inibição do crescimento (mm)				
		Sod 1Δ	Sod 2Δ	Sod 1Δ/Sod 2Δ	Cat 1Δ	Sod 1Δ/Cat 1Δ
50	10.75±1.50 ***a***b	12.25±2.21 **a*b	8.25±1.26 ***a***b	9.75±0.95 ***a***b	11.50±1.73 *a	9.00±0.81 **a
100	11.00±1.15 ***a***b	11.75±0.50 ***a*b	7.00±1.82 ***a***b	8.75±2.50 ***a***b	9.75±2.50 ***a*b	8.25±2.87 ***a*b
150	10.25±0.50 ***a***b	11.75±1.50 ***a*b	6.00±2.31 ***a***b	8.50±3.00 ***a***b	9.25±0.95 ***a*b	8.75±2.21 ***a*b
250	9.75±1.25 ***a***b	11.50±1.29 ***a*b	5.75±2.06 ***a***b	8.25±1.71 ***a***b	9.00±2.71 ***a*b	8.25±2.87 ***a*b
500	9.00±1.15 ***a***b	10.75±0.95 ***a*b	5.50±1.73 ***a***b	7.50±1.73 ***a***b	9.25±0.95 ***a*b	8.00±2.45 ***a*b
1000	7.00±2.70 ***a***b	9.50±0.57 ***a***b	5.00±1.63 ***a***b	7.25±0.95 ***a***b	8.25±2.22 ***a*b	6.50±1.29 ***a***b
H₂O₂	20.25±0.50	17.50±1.50	18.25±0.50	25.25±3.50	16.50±1.95	15.50±0.57
Rutina	6.50±1.73 ***a***b	9.00±1.82 ***a***b	3.50±1.29 ***a***b	4.75±2.36 ***a***b	5.75±1.71 ***a***b	4,50±0.57 ***a***b

Médias ± desvio padrão das medidas (mm) dos halos formados pela inibição do crescimento das linhagens em relação às concentrações e substâncias testadas. Foi utilizado ANOVA com teste de Tukey's com significância *** (P<0,001), ** (P<0,01) e * (P<0,05). Sendo "a" a significância em relação ao controle positivo (H₂O₂), "b" em relação ao controle negativo (salina).

As defesas antioxidantes enzimáticas incluem a atividade da Superóxido Dismutase (Sod), Catalase (Cat), Glutathione Peroxidase (GPx), Glutathione Redutase (GR) e Glutathione S-transferase (GST). Para minimizar os efeitos tóxicos dos radicais livres formados, é necessário um adequado equilíbrio das enzimas antioxidantes citadas acima (SIES, 1993).

Dentre os mecanismos apontados para as atividades antioxidantes observadas em todas as concentrações do extrato é possível sugerir efeitos sinérgicos e/ou aditivos dos compostos fenólicos presentes no extrato aquoso de *C. punctatum* que são relatados como sequestradores do radical hidroxil liberado pelo H₂O₂, bem como pela inibição da xantina oxidase. Os extratos também podem diminuir a toxicidade do H₂O₂, devido aos compostos fenólicos presentes no extrato, possivelmente, pelas atividades antioxidantes propostas para esses compostos pelos mecanismos de quelação de metal e/ou de radical livre, como descrito por Khokhar et al. (2003).

Os flavonóides constituem um grupo de substâncias naturais que possuem atividades biológicas diversificadas e esta classe de compostos fenólicos, bem como seus precursores biossintéticos são conhecidos pela sua ação antioxidante (RICHARDSON et al., 1974; RIOS et al., 1992). Esta ação protetora contra os danos causados pelo estresse oxidativo às biomoléculas justifica o emprego de extratos de plantas ricas nesses metabólitos secundários como agentes antioxidantes.

O princípio da atividade antioxidante baseia-se na disponibilidade de elétrons para neutralizar quaisquer radicais livres. Essa atividade antioxidante parece estar relacionada com o número e a natureza da hidroxilação do anel aromático da cadeia do composto em questão. Supõe-se que a capacidade de agir como doador de hidrogênio e inibidor da oxidação é melhorada pelo aumento no número de grupos hidroxila no anel fenólico. De acordo com Gülçin (2012), atualmente existe um crescente interesse em substâncias que apresentem propriedades antioxidantes, que são úteis para a saúde humana, tanto como componentes dos alimentos, quanto como substâncias preventivas que podem ser específicas de produtos farmacêuticos.

3.6.4 Estudo dos efeitos de reparo do extrato aquoso das folhas de *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* Cass. em *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com peróxido de hidrogênio

Os extratos aquoso das folhas de *C. punctatum*, a exemplo dos efeitos antioxidantes observados em co-tratamento, apresentou excelentes atividades de reparo do DNA de linhagens *S. cerevisiae* proficientes e mutadas em defesas antioxidantes após tratamento com o H₂O₂. Em todas as concentrações testadas e em todas as linhagens de *S. cerevisiae*, o extrato aquoso das folhas de *C. punctatum* conseguiu reverter os danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio, como apresentado na Tabela 9.

Tabela 8. Atividades de reparo do extrato aquoso das folhas de *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* Cass. observada frente aos danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio avaliadas pela inibição de halos em *Saccharomyces cerevisiae*.

Concentração (µg/mL)	Inibição do crescimento (mm)					
	Sod wt	Sod 1Δ	Sod 2Δ	Sod 1Δ/ Sod 2Δ	Cat 1Δ	Sod 1Δ/ Cat 1Δ
50	13.50±1.29 **a	11.75±1.25 **a*b	14.25±4.78	11.00±0.81 ***a***b	12.75±2.98	10.75±1.50 ***a***b
100	11.00±2.94 ***a*b	11.50±0.57 ***a*b	13.50±4.04	10.50±0.57 ***a***b	12.50±3.51	10.00±1.41 ***a***b
150	10.50±1.29 ***a**b	10.25±0.95 ***a**b	12.50±2.08 *a	10.00±0.81 ***a***b	11.25±1.70 **a	9.25±0.95 ***a***b
250	10.25±1.25 ***a**b	10.25±0.50 ***a**b	11.75±1.70 *a	9.25±0.50 ***a***b	11.50±1.29 *a	9.25±0.95 ***a***b
500	10.00±3.55 ***a**b	9.75±1.25 ***a**b	11.50±1.29 **a	9.25±0.95 ***a***b	11.00±2.00 **a*b	8.50±1.00 ***a***b
1000	10.00±0.81 ***a**b	9.25±0.95 ***a***b	6.00±2.70 ***a***b	6.25±2.63 ***a***b	10.00±1.63 **a**b	7.50±1.29 ***a***b
H₂O₂	20.00±3.55	17.75±2.06	18.55±1.50	20.50±1.00	17.75±2.06	18.25±1.25
Rutina	6.25±0.50 ***a***b	7.50±3.87 ***a***b	6.50±1.29 ***a***b	3.50±1.73 ***a***b	6.75±1.50 ***a***b	5.25±3.94 ***a***b

Médias ± desvio padrão das medidas (mm) dos halos formados pela inibição do crescimento das linhagens em relação às concentrações e substâncias testadas. Foi utilizado ANOVA com teste de Tukey's com significância *** (P<0,001), ** (P<0,01) e * (P<0,05). Sendo "a" a significância em relação ao controle positivo (H₂O₂), "b" em relação ao controle negativo (salina).

Compostos fenólicos, a exemplo dos flavonóides podem estar envolvidos em proteção antioxidantes, como também com reparo de DNA em células humanas expostas ao H₂O₂, especialmente no reparo por excisão de bases (BOUHLEL et al., 2008).

Danos ao genoma, ocasionados de forma espontânea ou induzidos por agente químicos e/ou físicos, como também por erros na replicação levando às mutações, resultam em doenças hereditárias e envelhecimento. Os danos em bases podem ser originados de espécies reativas de oxigênio, que também podem gerar quebras de DNA e radicais superóxidos, hidroxil e peróxido de hidrogênio. As EROs também oxidam RNA, lipídios, proteínas e nucleotídeos. A primeira linha de defesa contra os radicais livres são as enzimas superóxidos dismutases que atuam sobre os superóxidos, e as catalases que inativam a toxicidade do peróxido de hidrogênio (SLUPPHAUG et al., 2003).

O extrato aquoso das folhas de *C. punctatum* apresentou excelentes atividades protetoras, antioxidantes e reparadoras de instabilidade genética frente aos danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio em linhagens proficientes e deficientes em defesas enzimáticas antioxidantes. Entretanto, a realização de testes com os constituintes isolados do extrato torna-se importantes para que, a partir da comprovação da ação antioxidante dos seus constituintes, possam ser desenvolvidos produtos com outras aplicações, incluindo a farmacológica.

4 Conclusão

O presente estudo revelou que o extrato aquoso das folhas de *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* Cass. coletadas na cidade de Teresina/PI, não apresentou toxicidade frente a *Artemia salina*; proporcionou um decréscimo da leitura das absorvâncias em todas as concentrações testadas no ensaio do radical DPPH, sendo sua atividade antioxidante semelhante ao padrão rutina na concentração de 1000 µg/mL; através do teste com linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, o extrato aquoso mostrou excelente atividade antioxidante em todas as concentrações testadas, também não sendo um agente oxidante para *S. cerevisiae* e conseguindo proteger e reparar danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio nas leveduras. A triagem fitoquímica evidenciou a presença de taninos e compostos polifenólicos, sendo os últimos importantes achados na atividade antioxidante apresentada. A quantificação dos compostos fenólicos e flavonóides corroborou com o resultado da triagem fitoquímica, evidenciando no extrato um alto teor de

compostos fenólicos. Novos estudos para a caracterização de substâncias ativas e elucidação dos mecanismos de ação das atividades biológicas evidenciadas são necessários para confirmar a sua utilização etnomedicinal.

Referências

ABAD, M.J.; BERMEJO, P. *Baccharis* (Compositae): a review update. **Arkivoc**, v.7, p.76-96, 2007.

ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v.18, p.265-267, 1925.

ANI, V.; NAIDU, A.K. Antihyperglycemic activity of polyphenolic components of black/bitter cumin *Centratherum anthelminticum* (L.) Kuntze seeds. **European Food Research Technology**, v.226, p-897-903, 2008.

ARUMUGAM, N.; PAWAR, N.K.; Leaf extract of *Centratherum punctatum* exhibits antimicrobial, antioxidant and anti proliferative properties. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 4, p.71-76, 2011.

BARBOSA, W.L.R. Manual para análise fitoquímica e cromatografia de extratos vegetais. **Revista Científica da UFPA**, v.4, n.5, p. 1-19, 2004.

BENEDEK, B.; KOPP, B.; MELZIG, M.F. *Achillea millefolium* L: is the antiinflammatory activity mediated by protease inhibition? **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, p.321-7, 2007.

BEVELLE, C.A.; HANDY, G.A.; SEGAL, R.A.; CORDELL, G.; FARNSWORTH, N. R.Isocentratherin, a cytotoxic germacronolide from *Centratherum punctatum* (Compositae). **Phytochemistry**, v.20, n. 7, p.1605 –1607, 1981.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, v.181, n.4617, p.1199-1200, 1958

BOUHLEL, I.; VALENTI, K.; KILANI, S.; SKANDRANI, I.; SGHAIER, M.B.; MARIOTTE, A.M.; DIJOUX-FRANCA, M.G.; GHEDIRA, K.; HININGER-FAVIER, I.; LAPORTE, F.; GHEDIRA, L.C. Antimutagenic, antigenotoxic and antioxidant activities of *Acacia salicina* extracts (ASE) and modulation of cell gene expression by H₂O₂ and ASE treatment. ***Toxicology in vitro***, v. 22, p. 1264–1272, 2008.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. ***Lebensmittel Wissenschaft und Technologie***, v. 28, p. 25–30, 1995.

DHARMANANDA, S. **Golnuts and the Uses of Tannins in Chinese Medicine**. In: Proceedings of Institute for Traditional Medicine, Portland, OR, USA, 2003.

FARNSWORTH, N.R. Biological and phytochemical screening of plants. ***Journal of Pharmaceutical Sciences***, v.55, p. 225-276, 1966.

FABRI, R.L.; NOGUEIRA, M.S.; DUTRA, L.B.; BOUZADA, M.L.M.; SCIO, E. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. ***Revista Brasileira de Plantas Mediciniais***, v.13, n.2, p.183-189, 2011.

FERGUSON, L.R. Role of plant polyphenols in genomic stability. ***Mutation Research***, v.475, p.89–111, 2001

GASPARRI, S. **Estudo das atividades antioxidante e mutagênica/antimutagênica induzidas pelo extrato vegetal da *Costus spicatus***. 2005. 79f. Dissertação (Mestrado em Diagnóstico Genético e Molecular). Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2005.

GOULART, M.O.F.; OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.A. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

GRALLA, E. B.; VALENTINE, J. S. Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu, Zn superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation rates. **Journal of Bacteriology**, v.173, p. 5918-5920, 1991.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, v.86, p.345–391, 2012.

HENRIQUES J.A.P.; DAFRÉ A.L.; PICADA J.N.; MARIS A.F.; SALVADOR M. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. In: SERAFINI L.A.; DE BARROS N.M.; AZEVEDO J.L. (Eds.), **Biotechnologia na agricultura e na indústria**. Guaíça: Agropecuária, p. 227-256, 2001.

HUANG, D. J.; OU, B. X.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.6, p.1841–1856, 2005.

ISCAN, G. et al. Biological activity and composition of the essential oil of *Achillea schischkinii* Sosn. and *Achillea aleppica* DC. sbsp. *aleppica*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.170-3, 2006.

JAARSMA, D.; ROGNONI, F.; VAN DUIJN, W.; VERSPAGET, H.W.; HAASDIJK, E.D.; HOLSTEGE, J.C. CuZn superoxide dismutase (SOD1) accumulates in vacuolated mitochondria in transgenic mice expressing amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutations. *Acta Neuropathology*, v. 102, n.4, p. 293-302, 2001.

JEON, H.J. et al. Antiinflammatory activity of *Taraxacum officinale*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.115, p.82-8, 2008.

LIM, Y.Y.; LIM, T.T.; TEE, J.J. Antioxidant properties of several tropical fruits: a comparative study. **Food Chemistry**, v. 103, n.2, p. 1003 -1008, 2007.

LOCATELLI, M. GINDRO, R.; TRAVAGLIA, F.; COISSON, J.; RINALDI, M.; ARLORIO, M. Study of the DPPH-scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. **Food Chemistry**, v. 114, n. 3, p. 889-897, 2009.

LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; LIMA, M.R.F.; OMENA, M.C.; MENDONÇA, F.A.C.; BIEBER, L.W.; SANT'ANA, A.E.G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 199-206, 2005.

MARCO, F.; VALENTINA, G.; VERONICA, P.; FRANCESCA, G.; CHRISTIAN, C.; VALENTINA, A.; DAVIDE, P.; LORENZO, G.; RICCARDO, C.V.; LUISA, M.; MARIACHIARA, C. Toxic effects of harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovate* on invertebrate and vertebrate marine organisms. **Marine Environmental Research**, v. 76, p. 97-107, 2012.

MARRES, C.A.; VAN LOON, A.P.; OUDSHOORN, P.; VAN STEEG, H. Nucleotide sequence analysis of the nuclear gene coding for manganese superoxide dismutase of yeast mitochondria, a gene previously assumed to code for the Rieske iron-sulphur protein. **European Journal of Biochemistry**, v.147, p. 153-161, 1985.

MATOS, F.J.A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 3.ed. Fortaleza: UFC, 2009. 148p.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; McLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v. 45, n. 15, p. 31-34, 1982.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, v.26, n.2, p.211-9, 2004.

MORI, S.A.; SILVA, L.A.M.; LISBOA, G.; CORADIN, L. **Manual de manejo do herbário fanerogâmico**. Ilhéus, Centro de Pesquisa do Cacau, 1989.

NISHA, K. M.; PAIFY, K.P.; ABIDHA; VANAMAIL, P.; BALARAMAN, K. In vitro screening of medicinal plant extracts for macrofilaricidal activity. **Parasitology Research**, v.100, p 575-579, 2007.

NOGUCHI, N.; NIKI, E. Forum: Therapeutic Applications of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Human Disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, p. 1538–1546, 2000.

OGA, Z. **Fundamentos de toxicologia**. 2.ed. Editora Atheneu, São Paulo, p. 39 44, 2003.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OYEDEMI, S.O.; AFOLAYAN, A.J. Antibacterial and antioxidant activities of hydroalcoholic stem bark extract of *Schotia latifolia* Jacq. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, p. 952–958, 2011.

ORHAN, I.; KARTAL, M.; ABU-ASAKER, M.; SENOL, F.; YILMAZ, G.; SENER, B. Free radical scavenging properties and phenolic characterization of some edible plants. **Food Chemistry**, v. 114, p. 276-281, 2009.

PALANISAMY, U.D.; LING, L.T.; MANAHARAN, T.; Appleton, D. Rapid isolation of geraniin from *Nephelium lappaceum* rind waste and its anti-hyperglycemic activity. **Food Chemistry**, v.127, n. 1, p. 21-27, 2011.

PEIXOTO, T. J. S.; GOMES, T. L. B.; CARDOSO, K. C. M.; AMORIM, E. L. C. Otimização de metodologia analítica para o doseamento de flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 288-291, 2010.

PORTILLO, A. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.76, p.93-8, 2001.

RAKSHIT, K. D.; SANJAY, K. R.; VIKAS, K.; HARINDER, P.S. M.; KLAUS, B. Activities of *Jatropha curcas* phorbol esters in various bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 78, p. 57-62, 2012.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p.1231–1237, 1999.

RICHARDSON, G.A., EL-RAFEY, M.S., LONG, M.L. Flavones and flavone derivatives as antioxidants. **Journal of Dairy Science**, v. 30, p. 143-397, 1974.

RIOS, J.L., MAÑEZ, S., PAYA, M., ALCARAZ, M.J. Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis javalambrensis*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 6, p. 1947-1950, 1992.

RONALD, L. P.; XIANLI, W.U.; KAREN, S. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 18, p. 4290–4302, 2005.

ROSA,R.M.; SULZBACHER, K.; PICADA, J.N.; ROESLER, R.; SAFFI, J.; BRENDDEL,M.; HENRIQUES, J.A.P. Genotoxicity of diphenyl diselenide in bacteria and yeast. **Mutation Research**, v.563,p.107-115, 2004.

ROSA, R. M.; MELECCHI MI, HALMENSCHLAGER RC, ABAD FCI. Antioxidant and antimutagenic properties of *Hibiscus tiliaceus* L. methanolic extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54,p.7324-7330, 2006.

RUEBHART, D.R.; COCK, I.E.; SHAW, G.R. Brine shrimp bioassay: importance of correct taxonomic identification of *Artemia* (Anostraca) species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 23, p. 555–560, 2008.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURACALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**. v. 121, p. 996-1002, 2010.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence: review. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SLUPPHAUG, S.; BODIL KAVLI, HANS E. KROKAN. The interacting pathways for prevention and repair. **Mutation Research**, v. 531,p. 231–251, 2003.

SOARES, D.G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Brasileira de Ciência e Farmacologia**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 96-100, 2005.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA JUNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade

antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

STASIUK, M.; KOZUBEK, A. Biological activity of phenolic lipids. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.67, p.841–860, 2010.

TEPE, B.; SOKMEN, A. Screening of the antioxidative properties and total phenolic contents of three endemic *Tanacetum* subspecies from Turkish flora. **Bioresource Technology**, v. 98, p.3076-3079, 2007.

TIRAPÉGUI, J. **Nutrição: fundamentos e aspectos atuais**. 2. ed. São Paulo, SP: Atheneu, 2006.

YOKOZAWA, T.; OURA, H.; HATTORI, M.; IWANO, M.; DOHI, K.; SAKANAKA, S.; KIM, M. Inhibitory effect of tannin in green tea on the proliferation of mesangial cells. **Nephron**, v. 65, p.596–600, 1993.

O presente estudo revelou que o extrato aquoso das folhas de *C. punctatum* dispõe de uma grande quantidade de compostos fenólicos, flavonóides e taninos. Esses compostos são responsáveis pelas atividades biológicas evidenciadas por diversos autores como suas propriedades anti-helmínticas, anti-filiaríose e anti-hiperglicêmica, antioxidante, antimicrobiana e antiproliferativa.

Nossos estudos corroboram com as propriedades antioxidantes de *C. punctatum* relatadas em vários biomarcadores *in vitro* e *in vivo*, incluindo especialmente a aplicação de testes com *S. cerevisiae* que também confirmam a importância do extrato estudado, na inibição dos danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio, com excelentes atividades antioxidantes similares às enzimas superóxido dismutase e catalase.

O presente estudo ainda aponta a excelente atividade de proteção a danos oxidativos e de reparo de DNA em espécie proficiente e mutada em defesas de enzimas antioxidantes, como bem caracterizado para os efeitos do peróxido de hidrogênio em *S. cerevisiae*. Assim, o extrato aquoso das folhas de *Centratherum puctatum* ssp *punctatum* Cass. coletadas na cidade de Teresina/PI apresentou-se como uma fonte de metabólitos químicos de extrema importância na prevenção das doenças ocasionadas pelo estresse oxidativo e com uma excelente atividade antioxidante, protetora e reparadora de danos induzidos ao material genético.

Para dar continuidade ao trabalho, os pesquisadores propõem-se levantar informações sobre algumas etnoespécies utilizadas como medicinais da família Asteraceae, incluindo *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* Cass., identificar seus modos de preparos, indicações terapêuticas, bem como, proceder suas identificações botânicas, verificar a Importância Relativa (IR) e Fator de Consenso dos Informantes (FCI). Objetiva-se a realização de testes para caracterização química do extrato aquoso das folhas de *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* Cass. afim de subsidiar a elucidação dos grupamentos de metabólitos secundários com atividades farmacológicas significantes, através de técnicas com Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas; e, realização de testes para avaliação da atividade tóxica, citotóxica e mutagênica usando o sistema teste *Allium cepa*. Ainda propõe-se novos estudos com outros biomarcadores em eucariotos para a confirmação da atividade antioxidante de *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* Cass visando aplicações biotecnológicas, incluído novas formulações farmacêuticas para o tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo

REFERÊNCIAS

ADAMS, C.D. **Flowers plants of Jamaica**. Compositae. University of the West Indies, Mona, 1972, 183p.

AJILA, C.M.;NAIDU, K.A.; BHAT, S.G.; RAO, U.J.S. Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract. **Food Chemistry**, v. 105, p. 982-988, 2007.

ANNA, F.; DAE-OK, K.; SANG-JIN, C.; SUNG I. K.; OCK, K. C. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich us foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 1043-1048, 2011.

ANI, V.; NAIDU, A.K. Antihyperglycemic activity of polyphenolic components of black/bitter cumin *Centratherum anthelminticum* (L.) Kuntze seeds. **European Food Research Technology**, v.226, p-897-903, 2008.

ARMSTRONG, J.S.; WHITEMAN, M. "Measurement of reactive oxygen species in cells and mitochondria." **Methods in Cell Biology**, v. 80, p. 355-377, 2007.

ARUMUGAM, N.; PAWAR, N.K.; Leaf extract of *Centratherum punctatum* exhibits antimicrobial, antioxidant and anti proliferative properties. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 4, p.71-76, 2011.

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 444-447, 2007.

BANERJEE, G.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, V.C.; SCHUSTER, A.; JAKUPOVIC, J.; BOHLMANN, F. Further sesquiterpene lactones from

Elephantopus mollis and *Centratherum punctatum*. **Planta Medicinal.**, v.52, p. 29-32, 1986.

BARROS, R. F. M. A tribo Vernonieae Cass. (Asteraceae) em Áreas de Conservação de Cerrado do Estado do Piauí. Tese (Doutorado). Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, 2002.

BEVELLE, C.A.; HANDY, G.A.; SEGAL, R.A.; CORDELL, G.; FARNSWORTH, N. R. Isocentratherin, a cytotoxic germacrolide from *Centratherum punctatum* (Compositae). **Phytochemistry**, v.20, n. 7, p.1605 –1607, 1981.

BILINSKI T., KRAWIEC Z., LICZMANSKI A., LITWINSKA J. Is hydroxyl radical generated by the Fenton reaction *in vivo*? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 130, p. 533-539, 1985

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; KING, R.M.; ROBINSON, H. Naturally occurring terpene derivatives. Part 289. Seven guaianolides from the tribes Vernonieae. **Phytochemistry**, v.19, p. 2669-2673, 1980.

BORGES, L.L.; LUCIO, T.C.; GIL, E. S.; BARBOSA, E.F. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopedia Biosfera**, v.7, n.12, 2011.

BRAVARD, A.; AGERON-BLANC, A.; ALVAREZ, S.; DRANE, P.; LERHUN, Y.; PARIS, F.; LUCCIONI, C.; MAY, E. Correlation between antioxidant status, tumorigenicity, and radiosensitivity in sister rat cell lines. **Carcinogenesis**, v. 23, p. 705-711, 2002.

BROZMANOVÁ, J.; DUDAS, A.; HENRIQUES, J.A.P. Repair of oxidative DNA damage – an important factor reducing cancer risk. **Neoplasms**, v. 48, p. 85-93, 2001.

CABRERA, A.L.; KLEIN, R.M. Compostas – Tribo Vernonieae. In: REITZ R. (Ed.). **Flora ilustrada catarinense**. Herbário Barbosa Rodrigues. Itajaí, p.226-408, 1980.

CANTERLE L. P. **Erva-mate e atividade antioxidante**. 2005. 99p. Dissertação (Mestrado Ciência e Tecnologia dos Alimentos), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

CAO, G.H.; PRIOR, R. L. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. **Clinical Chemistry**, v. 44, p. 1309-1315, 1998.

CAPASSO, R. *et al.* Inhibitory effect of the herbal antidepressant St. John's wort (*Hypericum perforatum*) on rat gastric motility. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 376, n. 6, p. 407-414, 2008.

CAVALCANTE, M. F.; OLIVEIRA, M. C. C.; VELANDIA, J. R.; ECHEVARRIA, A. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v.23, n. 1, p.20-22, 2000.

CHANDRASEKAR, D, MADHUSUDHANA, K, RAMAKRISHNA, S, DIWAN, PV. Determination of DPPH free radical scavenging activity by reversed-phase HPLC: A sensitive screening method for polyherbal formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.40, p. 460-464, 2006.

CHIAPPETA, A. DA.; MELLO, J.F. Higher plants with biological activity Plants of Pernambuco II. **III Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 111, p. 99-111, 1984.

CRAVEIRO, A. A.; ANDRADE, C. H. S. ; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. Essential oils of Brazilian northeastern plants: *Centratherum punctatum*. **Journal of Natural Products**, v.47, p-743-745, 1984.

COSTA, V., FERREIRA, P.M. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 22, p. 217-246, 2001. ZDECKER, E.A. Antioxidant mechanisms. In: AKOH, D.; MIN, D.B. (Eds.) **Lipid chemistry**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, Inc. p 530–2, 2002.

DEMIRYUREK, A.T.; WADSWORTH, R.M. Superoxide in the pulmonary circulation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 84, n.3, p.355-365 (Review), 1999.

DI CARLO, G.; AUTORE, G.; IZZO, A. A.; MAIOLINO, N. P. Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: structure-activity relationship. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 45, p. 1054-1059, 1993.

DINIZ, M. F.; FERREIRA, L. T. Bancos genéticos de plantas, animais e microrganismos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.2, n.13, p. 3438, 2000.

DORTA, E. J. Introdução. In: **Escala rural**: especial de plantas medicinais. São Paulo: Escala, 1998.

EVANS, J. E. Osteoporosis and the role of diet. **British Journal of Biomedical Science**, v. 51, p. 358-370, 1994.

FERNANDEZ-CHECA, J.C.; KAPLOWITZ, N.; GARCIA-RUIZ, C.; COLELL, A. Mitochondrial glutathione: importance and transport. **Seminars in Liver Disease's**, v.18, p. 389–401, 1998. GBOLADE, A.A.; DZAMIC, A.M.; RISTIC,

M.S.; MARIN, P.D. Essential oil composition of *Centratherum punctatum* from Nigeria. **Chemistry of Natural Compounds**, v.45: p.118–119, 2009.

GLEASON, H.A. Vernoniaeae. **North American Flora**, v.33, n.1, p.47-110, 1922.

GOULART, M.O.F.; OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.A. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

GUIDOT, D.M.; McCORD, J.M.; WRIGHT, R.M.; REPINE, J.E. Absence of electron transport (rho state) restores growth of a manganese-superoxide dismutase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* in hyperoxia. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 26699-26703, 1993.

HALLIWELL, B.; MURCIA, M. A.; CHIRICO, S.; ARUOMA, O. I. Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: what they do and how they work. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.35, n.1/2, p.7-20, 1995.

HALLIWELL, B.; WISEMAN, H. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. **Biochemistry Journal**, v. 313, p.17–29, 1996.

HARBONE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.

HENRIQUES J.A.P.; DAFRÉ A.L.; PICADA J.N.; MARIS A.F.; SALVADOR M. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. In: SERAFINI L.A.; DE BARROS N.M.; AZEVEDO J.L. (Eds.), **Biotechnology na agricultura e na indústria**. Guaíba: Agropecuária, p. 227-256, 2001.

HOTTA, H.; SAKAMOTO, H.; NAGANO, S.; OSAKAI, T.; SUJINO, Y.;
Unusually large numbers of electrons for the oxidation of polyphenolic
antioxidants. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1526,
p.159-167,2001.

HWANG, E.S.; BOWEN, P.E. DNA damage, a biomarker of carcinogenesis: its
measurement and modulation by diet and environment. **Critical Reviews
in Food Science and Nutrition**. v.47, n.1, p. 27-50, 2007.

JAARSMA, D.; ROGNONI, F.; VAN DUIJN, W.; VERSPAGET, H.W.;
HAASDIJK, E.D.; HOLSTEGE, J.C. CuZn superoxide dismutase (SOD1)
accumulates in vacuolated mitochondria in transgenic mice expressing
amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutations. **Acta Neuropathology**, v.
102, n.4, p. 293-302, 2001.

KIM, K.W.; THOMAS, R.L. Antioxidative activity of chitosans with varying
molecular weight. **Food Chemistry**, 2006.

KIRKMAN, L. K. Taxonomic revision of *Centratherum* and *Phyllocephalum*
(Compositae:Vernonieae). **Rhodora**, v.83, p.1-24, 1981.

KONDO, K.; KURIHARA, M.; FUKUHARA, K. Mechanism of antioxidant effect
of catechins. **Methods in Enzymology**, v. 335, p.203–217, 2001.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI_FILHO, J.;
FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad
antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4,
p.726-732, 2005.

LANDMESSER, U.; CAI, H.; DIKALOV, S.; MCCANN, L.; HWANG, J.; JO, H.;
HOLLAND, S. M.; HARRISON, D. G. Role of p47phox in vascular oxidative

stress and hypertension caused by angiotensin II. **Hypertension**, v. 40, p. 511-515, 2002.

LAPLATINE, F.; RABEYRON P. L. **Medicinas paralelas**. São Paulo, SP: Editora Brasiliense, 1989. 120p.

LEITÃO FILHO, H. **Contribuição ao conhecimento taxonômico da tribo Vernonieae no estado de São Paulo**. 1972. 217f. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo.

LEITE, H. P.; SARNI, R. S. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 18, n. 2, p. 60-65, 2003.

LEJA, M.; MARECZEK, A.; WYZGOLIK, G.; KLEPACZ-BANIAK, J.; CZEKONSKA, K. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. **Food Chemistry**, v. 100, p. 237-240, 2007.

LIMA, A.A.; SUSSUCHI, E.M.; DE GIOVANI, W.F. Electrochemical and antioxidant properties of anthocyanins and anthocyanidins. **Croatica Chemical Acta**, v. 80, p. 29-34, 2007.

LIU, Z.Q.; MA, L.P.; LIU, Z.L. Making vitamin C lipophilic enhances its perspective effects against free radical induced peroxidation of low density lipoprotein. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 95, p. 49-57, 1992.

LONGO, V.D., LIU, L-L., VALENTINE, J.S., GRALLA, E.B. Mitochondrial superoxide decreases yeast survival in stationary phase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 365, p. 131- 142, 1999.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil – nativas e exóticas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA. São Paulo, 2002.

LUÍS, M.M.; MARCELA, A.S.; SALETTE, R.; JOSÉ, L.F.C.L. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, p. 1-19, 2008.

MAIA, G. L. A. **Estudo fitoquímico da espécie *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Reis (Fabaceae)**. 2008. 151 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2008.

MALME, N. Die compositen der ersten regnellschen expedition. **Kongl Svenska Vetensk Akad Handl**, v. 32, n.5, p.23-31, 1934.

MANCHAD, P.S.; TODARO, L.J.; CORDELL, A.G.; SOEJARTO, D.D. Isocentratherin. **The Journal of Organic Chemistry**, v.48, p.4388-4389, 1983.

MANCINI, B.; BERNARDI, A.C.; JORGE-NETO, J. Essential oil of *Centratherum punctatum* Cass. (Compositae): chromatographic and spectrophotometric analysis. **Revista Ciências Farmacêuticas**, v.5, p. 1-4, 1983.

MARIS, A.F.; ASSUMPÇÃO, A.L.K.; BONATTO, D.; BRENDEL, M.; HENRIQUES, J.A.P. Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in *Saccharomyces cerevisiae* is not an adaptive stress response and does not depend on functional mitochondria. **Current Genetics**, v. 39, p. 137-149, 2001.

MARRES, C.A.; VAN LOON, A.P.; OUDSHOORN, P.; VAN STEEG, H. Nucleotide sequence analysis of the nuclear gene coding for manganese superoxide dismutase of yeast mitochondria, a gene previously assumed to

code for the Rieske iron-sulphur protein. **European Journal of Biochemistry**, v.147, p. 153-161, 1985.

MATES, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v.153, p. 83–104, 2000.

MATEOS,R.; BRAVO,L. Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of biomarkers of oxidative damage to macromolecules (DNA, lipids, and proteins). **Journal of Separation Science**, v.30, n.2, p-175-191, 2007.

MUCHINETTI, L. V.; MARTINO, V. S. Atividades biológicas de flavonóides naturais. In: YUNES, R. A.; FILHO, V. C. (Orgs.) **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna Farmacognosia**, Editora Univali, 2006.

NAKAJIMA, J.N. **A família Asteraceae no Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil**. 2000. 467p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

NASCIMENTO, L.F. Estudo Fitoquímico dos constituintes caulinares, foliares e florais de *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (Amaranthaceae). IN: 58ª Reunião Anual da SBPC, 2006. **Anais...**São Paulo, 2006.

NEILL,S.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. Hydrogen peroxide signalling. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p.388–395, 2002.

NENADIS, N.; WANG, L.F.; TSIMIDOU, M.; ZHANG, H. Y. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS•+ assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4669–4674, 2004.

NISHA, K. M.; PAILY, K.P.; ABIDHA; VANAMAIL, P.; BALARAMAN, K. In vitro screening of medicinal plant extracts for macrofilaricidal activity. **Parasitology Research**, v.100, p 575-579, 2007.

NOLDIN, V. F.; CECHINEL, F.; MONACHE, V. DELLE. Chemical composition and biological activities of the leaves of *Cynara scolymus* L. (artichoke) cultivated in Brazil. **Química Nova**, v.26, n.3, p.331-334, 2003.

NUNES, J.M.S. *Estudo taxonômico das Vernoniae e Eupatorieae (Compositae) do estado de Pernambuco*. **Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 5, p.95-171, 1982.

OHNO, N.; CORMICKAND, S.M.C.; MABRY, T.J. Centratherin, a newgermacranolide from *Centratherum punctatum*. **Phytochemistry**, v.18, p-681-682, 1979.

OMS. Organização Mundial de Saúde. **Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales**. Genebra:OMS, 2003.

OURY T. D.; CHANG L. Y.; MARKLUND S. L.; DAY B. J.; CRAPO J. D. Immunocytochemical localization of extracellular superoxide dismutase in human lung. **Laboratory Investigation**, v.70, p.889–898, 1994.

PALANISAMY, U.D.; LING, L.T.; MANAHARAN, T.; Appleton, D. Rapid isolation of geraniin from *Nephelium lappaceum* rind waste and its anti-hyperglycemic activity. **Food Chemistry**, v.127, n. 1, p. 21-27, 2011.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; TABERNERO, M.; DÍAZRUBIO M. E.; SERRANO, J.; GONI, I.; SAURA-CALIXTO, F. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant, food, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**, v. 41, n. 3, p. 274-285, 2008.

PITMAN, V. **Fitoterapia**. As plantas medicinais e a saúde. Lisboa: Estampa, 1996. 188p.

PRUSKI, J.F. Asteraceae. In: STEYERMARK, J.A.; BERRY, P.E.; HOLST, B.K. **Flora of the Venezuelan Guayana: Araliaceae-Cactaceae**. Missouri Botanical Garden, Saint Louis. 1997.

RAYMUNDO, M.S.; HORTA, P.; FETT, R. Atividade antioxidante *in vitro* de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil), **Revista Brasileira de Ciências Farmacológicas**, v. 40, p. 495-503, 2004.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p.1231–1237, 1999.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005.

ROJKIND, M.; DOMÍNGUEZ-ROSALES, J.A.; NIETO, N.; GREENWEL, P. Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.59, n.11,p. 1872-1891, 2002.

RONALD, L. P.; XIANLI, W.U.; KAREN, S. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 18, p. 4290–4302, 2005.

SRINIVASAN, C.; LIBA, A.; IMLAY, J.A.; VALENTINE, J.S.; GRALLA, E.B. Yeast lacking superoxide dismutase show elevated levels of “free iron” as measured by whole cell electron paramagnetic resonance. **The Journal of Biological Chemistry**, v.275, p.29187-29192, 2000.

SHAHIDI, F.; ALASALVAR, C.; LIYANA-PATHIRANA, C. M. Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and hazelnut by products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 1212-20, 2007.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence: review. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, p.94-103, 1999.

SILVA, M. P. L.; ALMASSY JUNIOR, A. A.; SILVA, F. SILVA, M. **Levantamento etnobotânico e etnofarmacológico de plantas medicinais utilizadas por comunidades rurais de Mutuípe-Ba integrantes do “Projeto Ervas”**. Dissertação. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas, 2007.

SILVA, L. C. N.; SILVA JÚNIOR, C. A.; SOUZA, R. M.; MACEDO, A. J.; SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. S. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 2222-2228, 2011.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS/UFSC, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Editora da UFSC, 1.. 2010, 104 p

SINGH, M.; ARSENEAULT, M.; SANDERSON, T.; MURTHY, V.; RAMASSAMY, C. Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.4855–4873, 2008.

SIQUEIRA, J.M.; BOMM, M.D.; PEREIRA, N.F.G.; GARCEZ, W.S.; BOAVENTURA, M.A.D. Estudo Fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. **Revista Química Nova**, v. 21, p. 5, 1998.

SLEKAR, K.H., KOSMANN, D.J., CULOTTA, V.C. The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 28831-28836, 1996.

SOARES, D.G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Brasileira de Ciência e Farmacologia**, v. 41, n. 1, p. 96-100, 2005.

SOIKE, H.; PESCHLOW, E. L. Characterization of flavonoids from *Bacharis trimera* and their antihepatotoxic properties. **Planta Medica**, v. 53, p. 37-39, 1987.

SOMOGYI A.; ROSTA K.; PUSZTAI P.; TULASSAY. Z.; NAGY G. Antioxidant measurements. **Physiological Measurement**, v. 28, 2007.

SOUZA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA JUNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

TOMAZZONI, M. I. A Fitoterapia na atualidade. IN: TOMAZZONI, M. I. **Subsídios para a introdução do uso de fitoterápicos na rede básica de saúde do município de Cascavel/PR**. CURITIBA, 2004. Disponível em: <http://www.ibb.unesp.br/servicos/publicacoes/rbpm/pdf_v9_n3_2007/artigo2_v9_n3.pdf>.

VALDES, D.A.; BARDON,A.; CAN; CATALAN, T.E. GEDRIS e W. HERZ, W. Goyazensolides and Isogoyazensolides from Argentine *Centratherum punctatum* ssp. *punctatum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.26, p. 805-808, 1998.

VICENTINI, V. E. P.; CAMPAROTO, M.L.; TEIXEIRA, R.O.; MANTOVANI, M. S. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. **Acta Scientiarum**, v. 23, p. 593-598, 2001.

VOGEL, H.; GONZALEZ, M.; FAINI, F.;RAZMILIC, I.;RODRIGUEZ, J.; SAN MARTIN, J.; URBINA, F. Antioxidant properties and TLC characterization of four Chilean *Haplopappus* species known as bailahue'n. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, n.1, p.97-100, 2005.

WARDMAN, P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n.7, p. 995-1022, 2007.

APÊNDICE

Figura 1. Perfil fotomicrográfico da avaliação da atividade antioxidante dos extratos aquosos das folhas de *Centratherum punctatum* ssp *punctatum* Cass. coletadas na cidade de Teresina/PI, em *Saccharomyces cerevisiae*: (A) Pré-tratamento 1000 μ g/mL; (B) Pós-tratamento 150 μ g/mL; (C) Tratamento 1000 μ g/mL; (D) Co-tratamento 500 μ g/mL.

